

**Vérsejtlesezármazási vonalak vizsgálata**  
***Drosophila melanogaster*ben**

*Ph.D. értekezés*

Csordás Gábor

Témavezetők: Dr. Andó István és Dr. Honti Viktor

Biológia Doktori Iskola

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és  
Informatikai Kar

2014.

Szeged

# Tartalomjegyzék

<b>Köszönetnyilvánítás</b>	<b>4</b>
<b>1. Bevezetés</b>	<b>6</b>
1.1 A veleszületett immunitás	6
1.2 A <i>Drosophila melanogaster</i> - a veleszületett immunitás modellje	7
1.2.1 Az ecetmuslica vérsejtek vizsgálata - történeti áttekintés	8
1.2.2 Az embrionális vérsejtek	10
1.2.2.1 A feji-mezoderma - az embrionális makrofágok	11
1.2.2.2 A feji mezoderma - az embrionális kristálysejtek	13
1.2.2.3 A laterális mezoderma - az embrionális központi nyirokszerv	13
1.2.3 Az ecetmuslica lárvális vérsejtjei	14
1.2.3.1 A lárvális effektor vérsejtek - a plazmatociták	14
1.2.3.2 A lárvális effektor vérsejtek - a kristálysejtek	16
1.2.3.3 A lárvális effektor vérsejtek - a lamellociták	17
1.2.4 A lárvális vérsejtkompartmentumok	19
1.2.4.1 A lárva vérsejtkompartmentumai - a keringés	20
1.2.4.2 A lárva vérsejtkompartmentumai - a központi nyirokszerv	21
1.2.4.3 A lárva vérsejtkompartmentumai - a szesszilis szövet	23
1.2.4.4 Vérsejtkompartmentumok a lárva-báb-adult átalakulás során	25
1.2.5 A vérsejtképződés vizsgálatának lehetőségei	25
1.2.5.1 Vérsejtspecifikus molekulák	25
1.2.5.2 <i>In vivo</i> riporterek	27
1.2.5.3 Az ecetmuslica vérsejtképzését befolyásoló faktorok	30
<b>2. Célkitűzések</b>	<b>34</b>
<b>3. Anyagok és módszerek</b>	<b>35</b>
3.1 <i>Drosophila</i> törzsek	35
3.2 Anyagok	35
3.3 Ellenanyagok	36
3.4 Módszerek	37
3.4.1 Ecetmuslica lárvák immunindukálása	37
3.4.2 Vérsejtpreparátumok készítése	37
3.4.3 Kutikula-preparátumok készítése	38
3.4.4 Immunfluoreszcencia	38
3.4.5 Preparált vérsejtek fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata	38
3.4.6 <i>Drosophila</i> embriók videómikroszkópiája	39
3.4.7 A fagocitózis vizsgálata	39
3.4.8 A lárvák immobilizálása	39
3.4.9 Ellenanyagok előkészítése az <i>in situ</i> immunfestéshez	40

3.4.10 Ellenanyagok injektálása <i>Drosophila</i> lárvákba .....	40
3.4.11 <i>In situ</i> konfokális mikroszkópia és videómikroszkópia .....	41
3.4.12 Keringő vérsejtek immunfluoreszcens festése ellenanyag-keverékekkel .....	41
<b>4. Eredmények .....</b>	<b>42</b>
4.1 A vérsejtkompartmentumok embrionális eredete .....	42
4.2 A lárva vérsejtjeinek plaszticitása .....	47
4.2.1 A plazmatociták plaszticitása .....	48
4.2.2 A kristálysejtek plaszticitásának vizsgálata.....	54
4.3 A vérsejtleszármazási vonalak sorsa a bábban és a kifejlett egyedben.....	58
4.4 A szesszilis szövet vizsgálata élő lárvákban .....	62
<b>5. Az eredmények megvitatása .....</b>	<b>71</b>
5.1 A lárvális vérsejtek eredete és plaszticitása .....	71
5.2 A vérsejtek sorsa a lárva-báb-adult átmenet során.....	78
5.3 A vérsejtkompartmentumok vizsgálatának új módszere.....	80
<b>6. Az eredmények összefoglalása .....</b>	<b>82</b>
<b>7. Summary of the results .....</b>	<b>85</b>
<b>8. Referenciák.....</b>	<b>88</b>
<b>9. Saját közlemények jegyzéke .....</b>	<b>99</b>
<b>10. A rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>100</b>

# Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetem kifejezni **Dr. Andó Istvánnak**, amiért 2006-ban a csoportjához csatlakozhattam, és amiért nem csak lehetőséget adott, hanem végtelen energiájával buzdított arra, hogy megszeressem a kutatást. Köszönöm a türelmét, valamint az évek során nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom **Dr. Honti Viktornak**, aki segítségével bepillantást nyerhettem az *ecetmuslica* genetika rejtelseibe. Rengeteget tanultam tőle a szakmai alázatról, a dolgok értékéről és a tudományos gondolkodásról.

Köszönet jár **Dr. Márkus Róbertnek**, aki diákkörös témavezetésem vállalta magára, és elindított a *muslica* véresejtképzés rögzítés útján.

Köszönöm **Dr. Kurucz Évának** türelmét, szakmai segítségét és fáradhatatlan munkáját, melynek folyamányaként a laborban minden kísérlet rendben és gördülékenyen zajlott.

Köszönettel tartozom PhD hallgató társamnak, **Varga B. Gergely Istvánnak**, akivel számos kísérletet vállalva végeztünk, és hosszas szakmai vitákat folytattunk mindkettőnk okulására.

Köszönet jár **Balázs Anitának**, **Tápai Szilviának**, **Kovalcsik Olgának**, valamint **Képiró Anikónak** technikai segítségükért, mellyel nagyságrendekkel megkönnyítették a labormunkát.

Megköszönöm továbbá a **labor egykori és jelenlegi dolgozóinak**, amiért mindig számíthattam segítségükre, legyen az szakmai, vagy személyes tárgyú.

Hálával tartozom **Dr. Bajusz Izabellának** és **Dr. Gyurkovics Henriknek** a rendkívül tanulságos beszélgetésekért, tanácsaikért és ötleteikért, amelyek jobbra tették a munkámat, és engem is.

Megköszönöm **Dr. Jankovics Ferencnek** PhD tutori tevékenységét, melynek során sokat gazdagodtam szakmai és emberi szempontból egyaránt.

Köszönöm az SZBK **hatodik emeleti *Drosophila* közösségének**, hogy szakértelmükkel és segítségükkel hozzájárultak a dolgozat létrejöttéhez.

Köszönöm **Ferhan Ayaydinnak** és **Kószó Zsuzsának** a konfokális mikroszkóp használatában nyújtott segítségüket.

Köszönetem fejezem ki külföldi együttműködő partnereinknek, **Prof. Dan Hultmarknak**, **Prof. Utpal Banerjeenek**, **Dr. Michele Crozatiernek** valamint **Dr. Bruno Lemaitrenak**. Az általuk szolgáltatott reagensek, *ecetmuslica* törzsek a dolgozatban bemutatott munkához jelentős mértékben hozzájárultak.

Köszönettel tartozom **Dr. Erdélyi Miklósnak** PhD munkám során nyújtott segítségéért, valamint a kutatói pályáról szóló tanácsaiért.

Szeretnék köszönetet mondani **egykori tanárainak**, amiért megkedveltették velem a biológiát, a genetikát, és a tudományos gondolkodást. Közülük szeretném külön kiemelni **Dr. Gál Béla** gimnáziumi biológia tanáromat, valamint **Dr. Maróy Pétert** és **Dr. Török Tibort**, akik az egyetemen tartott Genetika kurzussal irányt adtak a tudományos gondolkodásomnak.

Külön köszönetem szeretném kifejezni **Dr. Mihály Józsefnek** és **Dr. Gácsér Attilának**, amiért rövid határidővel elvállalták dolgozatom bírálatát.

Hálás vagyok **Dr. Németh Tibornak** 15 éve tartó barátságáért, tisztán látásáért, valamint a szakmai és nem-szakmai témájú beszélgetéseinkért.

Végül szeretném megköszönni **családomnak, rokonaimnak és barátaimnak**, hogy kitartottak mellettem és hogy mindenben számíthattam rájuk. Köszönöm.

# 1. Bevezetés

## **1.1 A veleszületett immunitás**

Az élő szervezetekben az evolúció során olyan védekezési mechanizmusok fejlődtek ki, melyekkel hatékonyan tudták leküzdeni a fertőzéseket, legyenek azok vírusok, prokarióták, egysejtű vagy magasabbrendű paraziták. A veleszületett immunitás olyan ősi immunvédekezési folyamatok összessége, melyek az első számú védelmi vonalat képezik ezen betolakodókkal szemben. A természetes immunválasz részben a szolubilis faktorok kibocsátásán alapuló humorális immunválaszból, részben pedig specializált immunsejtek által végrehajtott celluláris (sejtközvetítette) immunválaszból tevődik össze.

A veleszületett immunitás humorális mechanizmusai között olyan makromolekulák szekrécióját fedezhetjük fel, melyek vagy közvetlenül a kórokozók eliminálásáért felelősek, vagy pedig közvetve, a sejt-közvetítette immunitást segítve játszanak szerepet a védekezésben. A sejt-közvetítette immunválasz során specializált immunsejtek direkt kapcsolatba lépnek a kórokozóval, majd vagy fagocitózis, vagy elhatárolás (tokképzés) segítségével megkísérlik eliminálni azokat.

A veleszületett immunválasz jellemzője, hogy gyorsan, közvetlenül a fertőzést követően aktiválódik, és az immunfolyamatok már néhány óra alatt is lezajszódhatnak. Az immunválasz kialakulásához szükséges a kórokozók azonosítása, amelyet olyan receptormolekulák végeznek, melyek evolúciósan konzerváltak, és a patogénekre általánosan jellemző molekuláris mintázatokat (PAMP-okat) ismernek fel. A veleszületett immunitás másik fontos tulajdonsága az immunmemória hiánya: a

veleszületett immunrendszer aktivációja a korábbi fertőzésektől függetlenül, jellemzően mindig azonos kinetikával zajlik le.

Az elmúlt évszázad során a veleszületett immunitás számos aspektusát vizsgálták, több, egymástól igen különböző modellszervezetet felhasználva.

## **1.2 A *Drosophila melanogaster* - a veleszületett immunitás modellje**

A rovarok immunrendszere humorális és sejtközvetítette faktorok hatékony együttműködésén alapul, így képes felvenni a küzdelmet a betolakodó mikroorganizmusokkal, többsejtű parazitákkal, valamint a tumorokkal (Carton és Nappi, 1997; Pastor-Pareja és mtsai., 2008) szemben. Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) a konzervált védekező mechanizmusok széles tárházát bevetve képes biztosítani a túlélését, többek közt antimikrobiális peptidek termelésével, mikróbák bekebelezésével, valamint a nagyobb idegen testek (például paraziták és petéik) körüli tokképzéssel (Lemaitre és Hoffmann, 2007). Ezen folyamatok számos faktor tekintetében hasonlóak a gerincesekben megtalálható immunmechanizmusokhoz, ezért azok modelljeként foghatók fel (Hultmark, 1994). Mivel az immunrendszer hasonlósága nem merül ki a végrehajtó fehérjék homológiájában, hanem felfedezhető a szabályozó lépéseket és a differenciálódást irányító faktorok szintjén is, ezért a *Drosophila melanogaster* az elmúlt évtizedekben a veleszületett immunitás kulcsfontosságú modellszervezetévé vált (Lemaitre és Hoffmann 2007; Ligoxygakis 2013; Kurata, 2010; Stuart és Ezekowitz 2008; Williams 2007; Jiravanichpaisal és mtsai., 2006).

A sejtközvetítette immunválasz végrehajtói, a vérsejtek (hemociták), az ecetmuslica teljes életciklusában jelen vannak. A gerincesekhez hasonlóan, itt is megfigyelhetők vérsejt kompartmentumok, vagyis olyan anatómiai egységek,

amelyekben a vérsejtek osztódnak és differenciálódnak (Lanot és mtsai., 2001; Márkus és mtsai., 2009; Krzemien és mtsai., 2010). Mivel a különböző fejlődési stádiumokban a muslica más és más veszélyeknek van kitéve, érthető, hogy az embrió, a lárva és a kifejlett rovar vérsejteinek, illetve vérsejt kompartmentumainak működése is különböző (Evans és Banerjee, 2003).

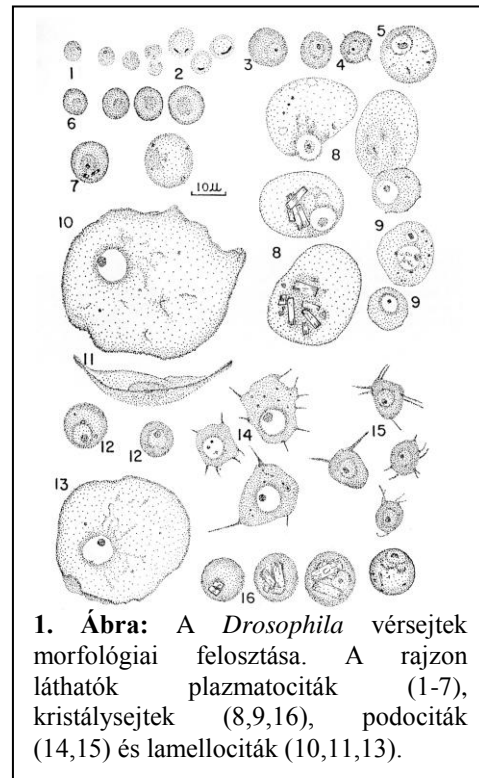
Az ecetmuslica vizsgálata páratlan lehetőséget biztosít egy többsejtű organizmus genetikai boncolására. Mivel az immunválasz alapvető elemei rendkívüli konzerváltságot mutatnak evolúciósan egymástól távol álló szervezetek között, ezért könnyen belátható, hogy a *Drosophila melanogaster* a veleszületett immunitás olyan felbontású vizsgálatára alkalmas, amelyet más modellszervezetben rendkívül nehéz kivitelezni.

### **1.2.1 Az ecetmuslica vérsejtek vizsgálata - történeti áttekintés**

Az ecetmuslica az 1950-es években került először a sejtközvetítette immunválasz vizsgálatának középpontjába (Rizki, 1957; Rizki és Rizki, 1959). Míg korábban nagyrészt Lepidoptera rovar-modelleket vizsgáltak (*Manduca sexta*, *Bombyx mori*), a *Drosophila* kidolgozott genetikai háttere és laboratóriumban való egyszerű fenntarthatósága miatt előtérbe került a veleszületett immunitás vizsgálatában. Elsőként Hosny el Shatoury írta le az ecetmuslica egy speciális szövetét, a központi nyirokszervet, azonban fénymikroszkópos megfigyelései alapján arra a konklúzióra jutott, hogy az általa vizsgált lárvákban nincsenek szabadon keringő vérsejtek (el Shatoury, 1955). Munkájára válaszként Tahir M. Rizki 1957-ben részletesen jellemezte a *Drosophila* lárva keringésében megtalálható vérsejttípusokat; morfológiai bélyegeket, és Giemsa, Hematoxylin, valamint Alcian-kék festések segítségével meghatározott négy fő sejtípust, továbbá azonosított számos átmeneti



sejtalakot is (Rizki, 1957). Megfigyelése szerint a lárva keringő vérsejtjeinek túlnyomó többsége 10 µm átmérőjű kerek sejt, melyet plazmatocitának nevezett el. Megfigyelt ritkán előforduló, állábakkal rendelkező sejteket (podocitákat), valamint nagyméretű, kiterült vérsejteket, úgynevezett lamellocitákat. Azonosította továbbá a zárványokat tartalmazó kristálysejteket is (Rizki, 1957; **1. Ábra**). A muslica vérsejtjeit ma is ezekbe az osztályokba soroljuk.



Kutatótársával - aki egyben felesége is volt - megállapították, hogy a vérsejtek képesek baktériumokhoz (Rizki és Rizki, 1980), valamint tumorokhoz (Rizki és Rizki, 1979) kötődni. Belátták, hogy a plazmatociták felelősek a mikróbák bekebelezéséért (Rizki és Rizki, 1980), valamint azonosítottak egy olyan tumort okozó mutációt (*tu<sup>SZ</sup>*; Rizki, 1960), melynek következtében a keringő vérsejtek száma megnő, és a lamellociták is nagy számban megjelennek a keringésben (Rizki és Rizki, 1979). A lamellocitákról kimutatták, hogy több rétegű tokot képeznek a tumorokon (Rizki és Rizki, 1979), illetve a bazális membránjukat vesztett transzplantált szöveteken (Rizki és Rizki, 1974), majd ez a tok az idő előrehaladtával melanizálódik.

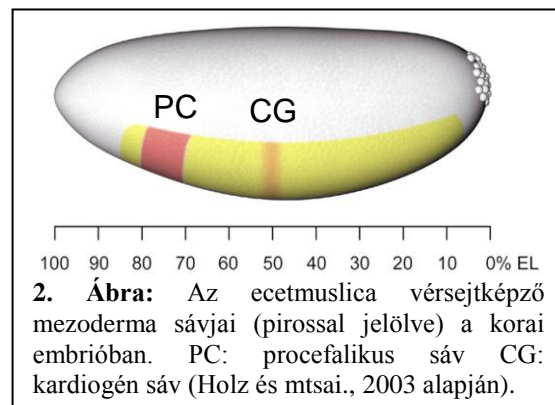
Az ecetmuslica lárváját a mikroorganizmusok mellett többsejtű paraziták is veszélyeztetik (Nappi, 1973). Ilyenek például a Figitidae családba tartozó parazitoid darazsak, azok közül is a Leptopilina nemzetség tagjai (Carton és Boulétreau, 1985; Rizki és Rizki., 1990). A nemzetség legalaposabban vizsgált faja a parazitózis modelljeként használt, a *Drosophila melanogasterre* specializálódott fürkészdarázs, a

*Leptopilina boulandi* (Rizki és Rizki., 1990). A *Leptopilina boulandi* a második stádiumú lárvákba helyezi a petéjét, amelyet a gazda tokképző reakcióval képes eliminálni (Carton és Boulétreau, 1985). A tokképzés során immunsejtek csoportosulnak a pete köré, majd a képződött tok melanizálódik. A melanizáció során a pete nagy mennyiségű reaktív oxigén származéknak van kitéve (Nappi és Vass, 1998), valamint tápanyagellátása a jól záródó tokok esetében teljesen megszűnik (Carton és Nappi, 1997). Amennyiben ez az immunreakció sikertelen, a bábállapot során a fejlődő parazitoid lárvá elfogyasztja a gazdát, majd vedlést követően kibújik a bábburokból (Rizki és mtsai., 1990).

Megfigyelték, hogy a fürkészdarazsak peterakását követően a vérsejtszám jelentősen megemelkedik, és a keringésben lamellociták jelennek meg, melyek a peték felszínén melanizálódó tokot képeznek (Rizki és Rizki, 1989).

### 1.2.2 Az embrionális vérsejtek

Az embrionális hemociták eredete az ontogenezis korai stádiumáig visszavezethető (Lebestky és mtsai., 2000; Holz és mtsai, 2003). A mezoderma kialakulásakor annak feji (procefalikus), valamint laterális



(kardiogén) szegmensében (2. Ábra) termelődni kezd a Serp (Srp) fehérje, amely egy GATA típusú transzkripciós faktor (Holz és mtsai, 2003; Rehorn és mtsai., 1996; Lebestky és mtsai., 2000). A Srp aktivitása az összes vérsejt-primordiumban megfigyelhető, és elengedhetetlen azok kialakulásához. Működését különféle transzkripciós kofaktorok befolyásolják: a U-shaped (Ush) egy GATA-kofaktor

(Friend of GATA), mely a Srp-hez kötődve gátolja annak transzkripció aktivitását (Fossett és mtsai., 2001). Amennyiben a Srp és Ush faktorokat kifejező sejtekben a Gcm (glial cells missing) és Gcm2 fehérjék is expresszálódnak, úgy ezek a sejtek a makrofág-leszármazási

vonál irányába köteleződnek

el (Lebestky és mtsai.,

2000). Azok a vérsejtek,

amelyekben a Ush által

kifejtett inhibíciót a

Lozenge (Lz) fehérje

gátolja, embrionális

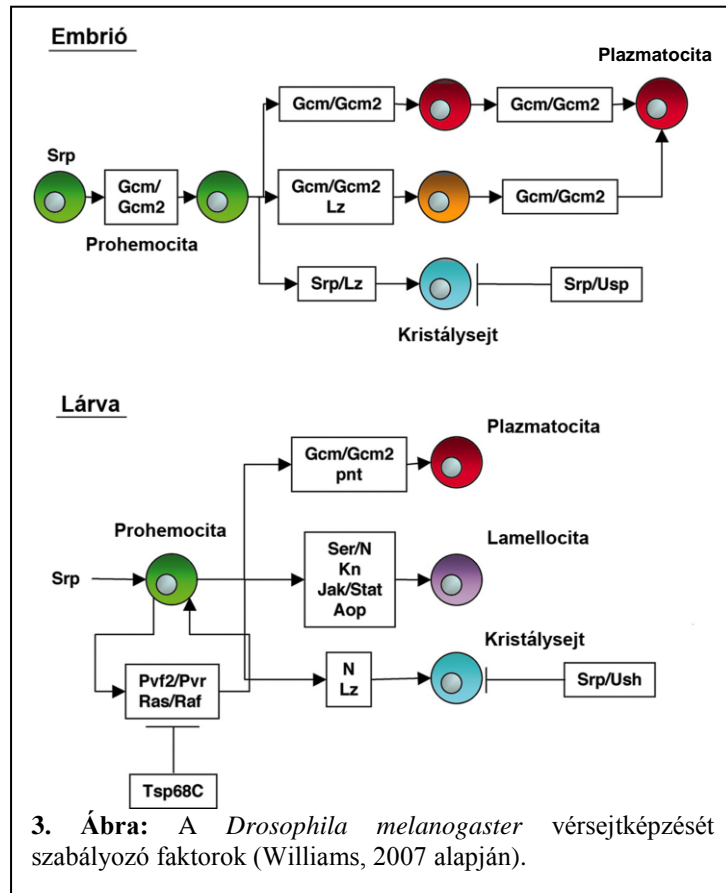
kristálysejteké

differenciálódnak (Waltzer

és mtsai., 2003; Muratoglu

és mtsai., 2006; Ferjoux és

mtsai., 2007; **3. Ábra**). A Lz

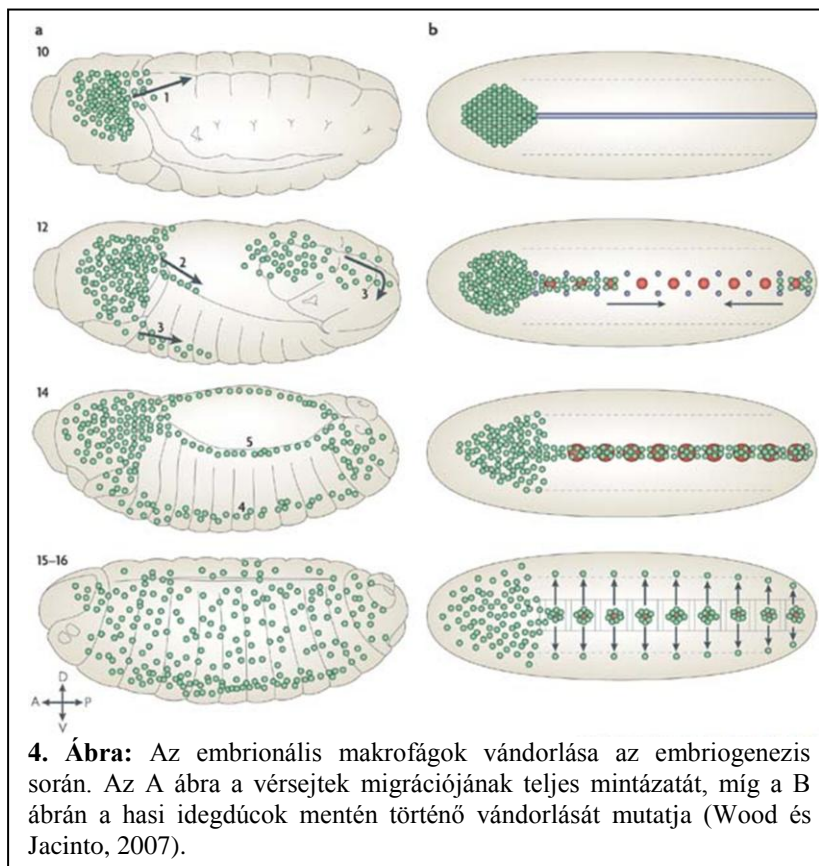


kifejeződését a Notch jelátviteli útvonal aktiválódása inicializálja, valamint tartja fenn a kristálysejtek differenciálódása során (Muratoglu és mtsai., 2006; Terriente-Felix és mtsai., 2013).

### 1.2.2.1 A feji mezoderma - az embrionális makrofágok

Az embrionális mezoderma procefalikus régiójából fagocita sejtek (embrionális makrofágok), valamint kristálysejtek differenciálódnak. A makrofágok az embriogenezis alatt irányítottan vándorolnak (Wood és mtsai., 2006; Siekhaus és mtsai., 2010): a "germ band extension" fejlődési fázis során a feji szelvényekből egy

jelentős részük átvándorol az embrió kaudális végébe, majd a "germ band retraction" fázist követően a középvonal mentén a két véresejtcsoport egymás irányába mozog (Tepass és mtsai., 1994; Wood és mtsai., 2006; **4. Ábra**). A háti záródás során a makrofágok oldalirányba, a laterális felszínen vándorolnak (Wood és mtsai., 2006). A migráció részletes elemzése során kimutatták, hogy a folyamatot kemokinekhez hasonló molekulák irányítják: a vándorlás útvonalát a Pvf1, Pvf2 és Pvf3 fehérjék határozzák meg, melyek az embrionális szövetek felszínén találhatók, és a környéki idegrendszer neuronjai szekretálják (Wood és mtsai., 2006). Az embrionális makrofágokon található Pvr molekulák a Pvf fehérjék receptorai. A Pvr szignalizáció a sejtváz-átrendeződéséhez és lamellipodiumok képződéséhez vezet, amelyben többek közt az Enabled és a Fascin is fontos szerepet játszanak (Zanet és mtsai., 2009; Tucker és mtsai., 2011).



Az embrionális makrofágok migrációjának funkcióját 2010-ben ismerték fel: Evans és munkatársai szerint a makrofágok szükségesek a környéki idegrendszer megfelelő struktúrájának kialakulásához, ugyanis vándorlásuk során ezek kebelezik be a sejthalálra ítélt sejteket, valamint az apoptotikus törmeléket (Evans és mtsai., 2010; Nagaosa és mtsai., 2011). Az apoptotikus maradványok fagocitózisával számos sejtfelszíni receptorfehérjét kapcsolatba hoztak, többek közt a CD36-homológ Croquemort-ot (Crq) (Franc és mtsai., 1996), az EGF-szerű doméneket tartalmazó NimrodC4-et (NimC4) (Kurucz és mtsai., 2007a; Kurant és mtsai., 2008), valamint a Draper-t (Manaka és mtsai., 2004; Fujita és mtsai., 2012).

#### **1.2.2.2 A feji mezoderma - az embrionális kristálysejtek**

A makrofágokkal ellentétben a kristálysejtek a teljes embriogenezis során a képződésük helyén, a középbél mellett maradnak, ahol két csoportot alkotnak, melyek egyenként körülbelül 10-15 sejtből állnak (Lebestky és mtsai., 2000). Mivel a kristálysejtek embrionális funkciója jelenleg nem ismert, feltételezhető, hogy csak a későbbi fejlődési stádiumokban van rájuk szükség.

Az embrionális kristálysejtekre jellemző, hogy kifejezik a Lz transzkripció faktort, amely a sejtsorsuk rögzítéséhez nélkülözhetetlen. Megfigyelték azonban, hogy a Lz az embrionális makrofágok egy részében is kifejeződik (Bataillé és mtsai., 2005). Azt, hogy ezekből a sejtekből a lárva stádiumban milyen effektorok differenciálódnak, még nem sikerült meghatározni.

#### **1.2.2.3 A laterális mezoderma - az embrionális központi nyirokszerv**

A kardiogén (laterális) mezoderma sejtei az embriogenezis során hemangioblasztokká - a szívcső, a perikardiális sejtek, valamint a központi

nyirokszerv közös őssejtjeivé - differenciálódnak, majd az anterior hemangioblasztok a bennük kifejeződő Srp és Odd-skipped (Odd) fehérjék hatására központi nyirokszerv-irányba fejlődnek tovább (Mandal és mtsai., 2004).

Az embrió központi nyirokszerve elsődleges és másodlagos lebenyekre tagolható. Ebben a fejlődési stádiumban az elsődleges lebenyt még csak néhány tíz sejt alkotja, a másodlagos lebenyek pedig csupán egyetlen sejtsorból állnak (Lebestky és mtsai., 2000, Mandal és mtsai., 2004). Az elsődleges lebeny sejtjei között fagocita- és kristálysejt prekursorok találhatók, melyek még nem fejezik ki az érett effektorokra jellemző molekuláris markereket (Lebestky és mtsai., 2000; Mandal és mtsai., 2004).

### **1.2.3 Az ecetmuslica lárvális vérsejtjei**

A sejt-közvetítette immunitás vizsgálata során az ecetmuslica lárva vérsejtjeit jellemezték legrészletesebben. A lárvális stádiumban három effektor vérsejttípus különíthetünk el: plazmatocitákat, kristálysejteket és lamellocitákat (**5. Ábra**).

#### **1.2.3.1 A lárvális effektor vérsejtek - a plazmatociták**

A plazmatociták hozzávetőleg 10 µm átmérőjű kerek sejtek, melyek a keringő hemociták több mint 90 százalékát teszik ki (Rizki, 1957). Számos funkciójukat azonosították, melyek közül a legfontosabb a mikróbák, valamint apoptotikus törmelékek bekebelezése (Ulvila és mtsai., 2011). Több, egymástól független kutatócsoport is azonosított olyan molekulákat, melyek a fagocitózis első lépéséhez, a célpontok felismeréséhez szükségesek. Ilyen molekula például az Eater (Kocks és mtsai., 2005; Chung és Kocks, 2011), a NimrodC1 (NimC1; Kurucz és mtsai., 2007a; Zsámboki és mtsai., 2013), valamint a Draper (Manaka és mtsai., 2004; Fujita és mtsai., 2012). Ezen fehérjék mindegyike EGF-szerű ismétlődéseket, úgynevezett

NIM-repeat-eket tartalmaz (Somogyi és mtsai., 2008). A fehérjék hiányában a plazmatociták bekebelező képessége jelentősen sérül: az *eater* null mutáns lárvákból származó plazmatociták *Staphylococcus aureus* bekebelező képessége szignifikánsan romlik (Kocks és mtsai., 2005), a *nimC1* RNS-interferenciával történő csendesítése a vérsejtek *S. aureus* és *Escherichia. coli* fagocitáló kapacitásának csökkenéséhez vezet (Kurucz és mtsai., 2007a). A CD36 scavenger receptorral homológ Crq-ról (Franc és mtsai., 1999), a NimC4 fehérjéről (Kurant és mtsai., 2008), valamint a Draper-ről (Manaka és mtsai., 2004) kimutatták, hogy az apoptózis során keletkezett sejtmaradványokat ismerik fel, és indukálják azok bekebelezését.

A plazmatociták a bekebelezésen kívül más feladatokat is ellátnak: extracelluláris mátrix fehérjéket és antimikrobiális peptideket termelnek és választanak ki. A mátrixfehérjék szintézisének a sebgyógyulás során van kiemelt szerepe: a plazmatociták a nyílt sebhez vándorolnak, ahol a koagulátum képzéséhez járulnak hozzá (Martinek és mtsai., 2008). Bár az antimikrobiális peptidek elsőszámú forrása a lárvális zsírtest, a plazmatociták is képesek termelni azokat (Samakovlis és mtsai., 1990), feltételezhetőleg azért, hogy a betolakodókat lokális immunreakcióval minél hamarabb hatástalanítani tudják (Samakovlis és mtsai., 1990). Az is ismert, hogy az antimikrobiális peptidek egy része permeabilizálja a bakteriális sejtfalat, így olyan molekulák kerülnek a felszínre, melyeket a fagocitózis-receptorok (például az Eater) képesek megkötni (Chung és Kocks, 2011).

Leírták, hogy a plazmatociták a betolakodók érzékelését követően jelmolekulákat szekretálnak, melyek aktiválják a zsírtestben a Toll és az Immune deficiency (Imd) útvonalakat, így a helyi immunválaszból a teljes szervezetre kiterjedő szisztémás immunválaszt alakítanak ki. Ebben az átkapcsolási folyamatban kulcsfontosságú szerepet tölt be a Psidin fehérje, mely a fertőzést követően a

plazmatocitákban termelődik, és a fagocitált baktériumok lízisén kívül a zsírtest immunindukciójához is szükséges (Brennan és mtsai., 2007). Újabb vizsgálatok azonban rámutattak, hogy az immunválasz olyan lárvákban is szisztémássá válik, amelyek nem tartalmaznak vérsejteket (Defaye és mtsai., 2009). Az ellentmondás feloldása lehet az az elképzelés, hogy a plazmatociták szerepe nem a teljes szervezetet érintő immunválasz beindításában, hanem csupán annak gyorsításában, vagy erősítésében keresendő. A plazmatociták nem képesek bizonyos mérettartomány feletti idegen testek fagocitózisára. Ilyen esetekben azonban fontos szerepet töltenek be egy másik védekező folyamat, a tokképző reakció inicializálásában. A folyamat során a vérsejtek hozzátapadnak az idegen partikulumhoz, kiterülnek, és sejtdhéziós molekulákon keresztül kapcsolatokat alakítanak ki egymás között (Williams és mtsai., 2005). A plazmatociták által képzett sejtréteg ezt követően a kitapadás alapját biztosítja a később differenciálódó, dedikált tokképző sejtek számára.

A tokképzés korai lépései az idegen partikulumok és a tumorok esetében rendkívül hasonlóak. Megfigyelték, hogy a *Ras<sup>VI2</sup>/scrib<sup>-/-</sup>* genotípusú testi tumorokat plazmatociták veszik körül. Amennyiben a plazmatocitákat szövetspecifikus apoptózis indukálásával eltávolítják a lárvából, a tumorok mérete szignifikánsan megnő (Pastor-Pareja és mtsai., 2008).

### **1.2.3.2 A lárvális effektor vérsejtek - a kristálysejtek**

A kristálysejtek a lárv keringésének kevesebb, mint 5 százalékát alkotó, a plazmatocitáknál valamivel nagyobb sejtek (Rizki, 1957). Különös ismertető jegyük, hogy citoplazmájukban különböző méretű, hasáb alakú kristályokat tartalmaznak. A kristályok nagy mennyiségű profenoloxidáz enzimből épülnek fel (Rizki és Rizki, 1959), mely - aktivált formában - a fenolokat kinonokká alakítja. Azt is megfigyelték,



hogy a melanizáció során a kristálysejtek elveszítik a kristályaikat, amelyek a hemolimfába jutnak, ahol az enzim aktiválódik (Rizki és Rizki, 1959). Azt a folyamatot, melynek során a kristályok kijutnak a hemolimfába, még nem sikerült pontosan leírni. Egyes elképzelések szerint a kristálysejtek membránja a JNK szignalizáció hatására felszakad, és a sejt elpusztultával a szérumba kerülnek a kristályok, valamint olyan szignálmolekulák melyek a vérsejtek differenciálódásában játszanak szerepet (Bidla és mtsai., 2007). Újabb eredmények azonban arra utalnak, hogy a kristálysejtek az általuk tárolt profenoloxidáz-kristályok mellett, ha kis mértékben is, de folyamatosan, a hemolimfába szekretálják ezt az enzimet (Binggeli és mtsai., 2014).

#### **1.2.3.3 A lárvális effektor vérsejtek - a lamellociták**

A harmadik effektor sejttípus, a lamellocita, hozzávetőlegesen 40-50 µm átmérőjű, kiterült immunsejt. A lárvális fejlődés során mindössze néhány lamellocita található a késői harmadik stádiumú állatok keringésében. Megfigyelték azonban, hogy parazitoid darázsfertőzést követően a keringésben lamellociták jelennek meg (Nappi, 1973, Rizki és Rizki, 1992). A kísérletek azt is bebizonyították, hogy a lamellociták a parazitoid által beinjektált pete körül többretegű tokot képeznek, mely később melanizálódik (Nappi, 1973). A melanizált token belül megemelkedik a reaktív oxigén származékok koncentrációja, és ez az oxidatív stressz, valamint a tápanyagtól való elzárttság a pete elpusztulásához vezet (Nappi, 1973). Ugyanakkor azt is megfigyelték, hogy bizonyos specialista fürkészdarazsak olyan immunszuppresszánsokat juttatnak a lárvába, amelyek gátolják a lamellociták differenciálódását, vagy megváltoztatják azok morfológiáját, ezáltal lehetetlenné téve

a lamellociták kitapadását (Rizki és Rizki, 1990; Rizki és Rizki, 1991; Labrosse és mtsai., 2005).

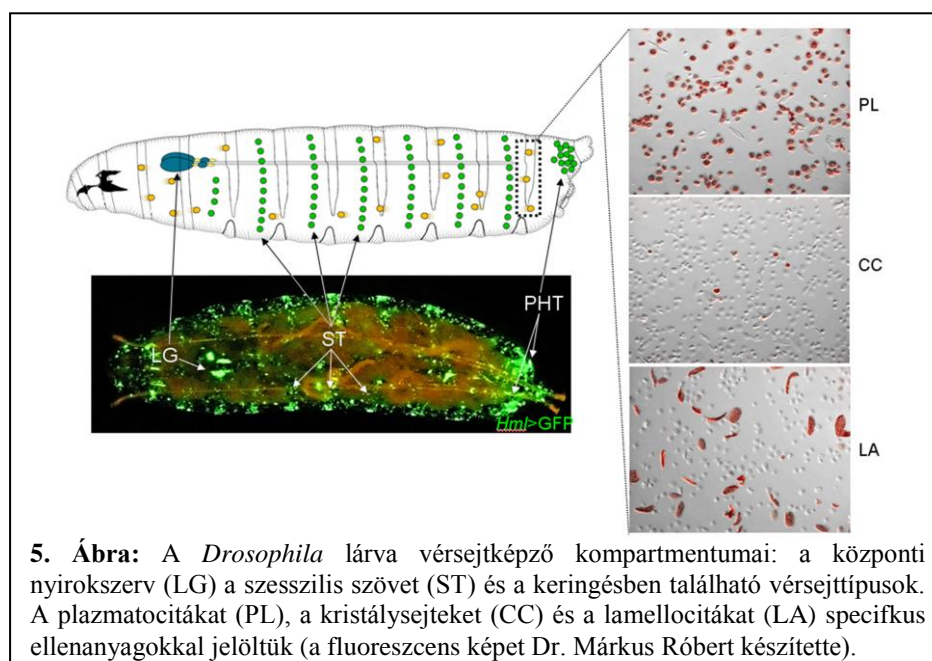
Mivel a lárvális epidermisz steril üvegkapillárisal történő felsértése is lamellocita-differenciálódást okoz, felmerült annak a lehetősége, hogy a fizikai sérülés, vagy a bazális membrán roncsolása indukálhatja ennek a vérsejttípusnak a képződését (Márkus és mtsai., 2005). Ezt alátámasztó eredmények találhatók Rizki és Rizki tanulmányában, ahol rámutatnak, hogy az olyan zsírtest-darabok, melyeken a bazális membrán sérülést szenved, lamellocita differenciálódást okoznak, és a sérült zsírtest körül ezek a lamellociták tokot képeznek (Rizki és Rizki, 1979). Könnyen elképzelhető, hogy ezen megfigyelések háttérében a transzplantáció okozta trauma, valamint a beültetett idegen szövet felismerésének kombinált hatása áll. Újabb vizsgálatok ugyanis kimutatták, hogy az imágókorongokat körülvevő bazális membrán metalloproteázokkal történő *in vivo* eltávolításának hatására ugyan kitapadnak plazmatociták az érintett felületekre, azonban lamellociták nem differenciálódnak (Pastor-Pareja és mtsai., 2008).

Számos kutatócsoport foglalkozik a lamellociták differenciálódásában szerepet játszó faktorok azonosításával és jellemzésével. Egy 2004-ben közölt tanulmányban több jelátviteli útvonalról is kiderült, hogy szerepük van a tokképző sejtek differenciálódásának szabályozásában; a JAK/STAT kaszkád, a JUN szignalizáció, valamint a EGFR/RAS jelátvitel aktiválása a vérsejtekben mind lamellociták képződését okozta (Zettervall és mtsai., 2004). Később a jelátviteli utak részletes vizsgálata mindhárom esetben alátámasztotta ezen szignálok kapcsolatát a lamellocita differenciálódással (Sinenko és mtsai., 2004, Sorrentino és mtsai., 2004, Krzemien és mtsai., 2010).

Az általános jelátviteli utakon túl sikerült az embrionális véresejtdifferenciálódás kapcsán jellemzett faktorokról is belátni, hogy azok a lárva stádiumban befolyásolják a lamellociták képződését. Sorrentino és munkatársai kimutatták, hogy a plazmatocita identitás meghatározásához szükséges *ush* gén mutációja spontán lamellocita képződéshez vezet (Sorrentino és mtsai., 2007), míg Kroeger és munkatársai a vésejt-sorsot alapjaiban meghatározó *Srp* transzkripciósfaktort túltermelve tapasztaltak hasonló jelenséget (Kroeger és mtsai., 2012).

### **1.2.4 A lárvális vésejtkompartmentumok**

Az ecetmuslica vésejtjeinek egy része ugyan a hemolimfában szabadon mozog az állat nyílt keringési rendszerében, ám megfigyelhetők olyan helyhez kötött vésejt populációk is, amelyekben vésejtképzés történik. A lárvában, amely a vésejtek képződése szempontjából legjobban tanulmányozott fejlődési stádium, három kompartmentumot különíthetünk el: a keringést, a központi nyirokszervet, valamint a szesszilis szövetet (Lanot és mtsai., 2001; Sorrentino és mtsai., 2002; Zettervall és mtsai., 2004; **5. Ábra**).



#### **1.2.4.1 A lárva vérsejtkompartmentumai - a keringés**

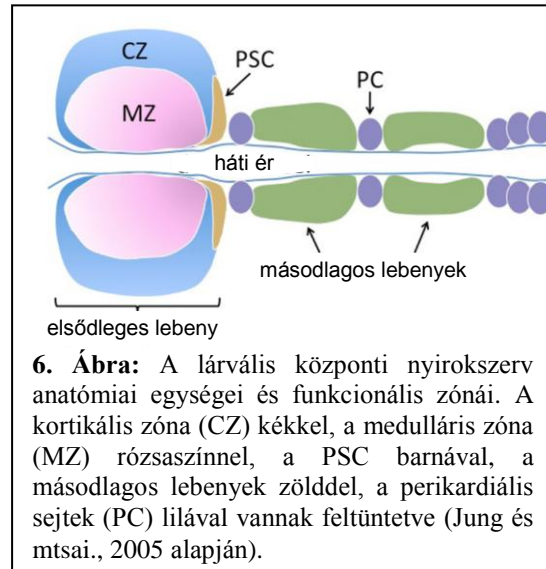
Az *ecetmuslica* nyílt keringési rendszerében a vérsejtek szabadon áramolnak. Az áramlást a szívcső biztosítja: periodikus összehúzódásokkal a poszterior végen található nyílásokon beszívott hemolimfát anterior irányba pumpálja (Tao és Schulz, 2007). A lárva keringésében a vérsejtszám a fejlődés során növekszik; az első stádiumú lárvában hozzávetőleg 200 hemocita található, míg a késői 3. stádiumú lárva vérsejtszáma a 2000-et is meghaladhatja (Lanot és mtsai., 2001). Ezen sejtek több mint 90 százaléka plazmatocita, a fennmaradó része pedig kristálysejt. A harmadik effektor vérsejttípus, a lamellocita kizárólag immunindukciót követően differenciálódik nagy számban (Rizki és Rizki, 1989). A parazitoidok általi immunindukciót követően a keringésben azonban nem csak egy új sejttípus jelenik meg, hanem a keringő össz-sejtszám is jelentősen megemelkedik (Lanot és mtsai., 2001). Ez részben a keringő sejtek osztódásával magyarázható, részben viszont a többi vérsejtkompartmentum aktivációjának és mobilizációjának a következménye (Sorrentino és mtsai., 2002; Márkus és mtsai., 2009; Honti és mtsai., 2010).

Mivel az összes keringő vérsejt besorolható valamelyik funkcionális alosztályba, valódi prekursor sejteket (melyek nem jellemezhetők differenciálódási markerekkel) ebben a kompartmentumban nem találunk (Babcock és mtsai., 2008).

A hemolimfának számos olyan humorális komponense van, melyek a sejtes immunválaszt segítik elő. Ilyenek például az opszoninok, melyek a fagocitózis hatékonyságát növelik azáltal, hogy a mikrobák felszínéhez kötődnek (Jiravanichpaisal és mtsai., 2006). A hemolimfában található antimikrobiális peptidok a betolakodókat közvetlenül is képesek elpusztítani, illetve a mikrobiális sejtfal roncsolásával olyan molekulákat exponálnak, melyeket a fagocitózis receptorok nagy hatékonysággal felismernek (Chung és Kocks 2011).

#### 1.2.4.2 A lárva vérsejtkompartmentumai - a központi nyirokszerv

A központi nyirokszerv a *Drosophila melanogaster* lárva legrészletesebben vizsgált és legalaposabban megismert vérsejtképző szöve. A szívcső elülső szakaszán elhelyezkedő hematopoietikus szerv páros lebenyekre tagolt, amelyeket perikardiális sejtek választanak el egymástól (Röhrborn, 1961). A központi nyirokszervet alkotó sejtek száma a lárvális fejlődés során folyamatosan



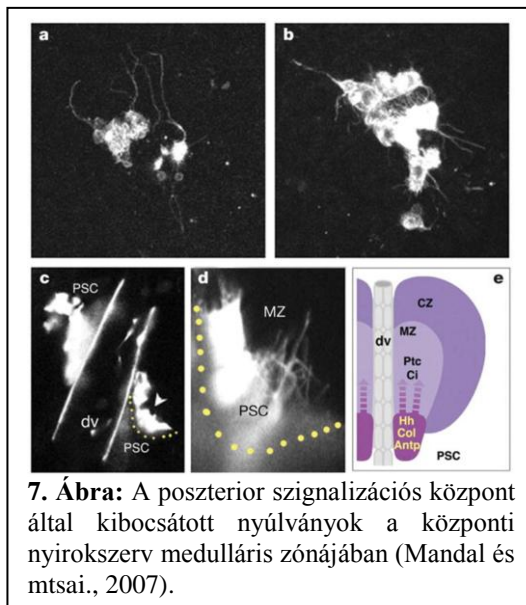
növekszik, különös tekintettel az első pár (vagyis elsődleges) lebenyre (Shrestha és Gateff, 1982). Az elsődleges lebeny részletes jellemzése során kiderült, hogy funkcionális zónákra osztható: a kérgi- (kortikális) és a velő (medulláris) zónára, valamint a lebeny poszterior végében található poszterior szignalizációs központra (PSC, Posterior Signalling Centre; Jung és mtsai., 2005; Krzemien és mtsai., 2007; **6. Ábra**). Az egyes zónák az azokat alkotó sejtek morfológiájában, valamint a differenciálódási markerek kifejeződésében is különböznek egymástól.

A kortikális zónát differenciálódott effektor sejtek (plazmatociták és kristálysejtek) alkotják. A kortikális zóna az első lárvális stádiumban egy sejtrétegből áll, azonban a késői harmadik stádiumban már a központi nyirokszerv sejtjeinek túlnyomó többségét ez a zóna tartalmazza (Lebestky és mtsai., 2003; Jung és mtsai., 2005; Krzemien és mtsai., 2010).

A medulláris zónában éretlen vérsejtek (prohemociták) találhatók, melyek nem fejeznek ki sem plazmatocitákra, sem kristálysejtekre, sem lamellocitákra jellemző

differentiálódási markereket (Minakhina és Steward, 2010; Tokusumi és mtsai., 2012). A prohemociták a plazmatocitáknál kisebb, 4-5  $\mu\text{m}$  átmérőjű sejtek, térfogatuk nagy részét a sejtmag tölti ki (Minakhina és Steward, 2010). A medulláris zóna területén intenzív sejtosztódás játszódik le. A prohemociták differenciálódásuk során a medulláris zóna periferiájára kerülnek, majd belépnek egy átmeneti - a medulláris és a kortikális zóna között elhelyezkedő - zónába, ahol vegyesen találhatók éretlen plazmatociták, kristálysejtek, valamint prohemociták (Krzemien és mtsai., 2010). Innen további differenciálódási lépéseket követően a sejtek a kérgi zónába jutnak (Krzemien és mtsai., 2007; Krzemien és mtsai., 2010; Gao és mtsai., 2011). A progenitor sejtekről leírták, hogy a parazitoid darázs általi fertőzést követően lamellocitákká differenciálódnak (Sorrentino és mtsai., 2002), sőt, sokáig úgy gondolták, hogy a lamellociták kizárólag ezekből az őssejtekből származnak (Minakhina és Steward, 2010).

A medulláris zónában a vérsejtek érését a központi nyirokszerv harmadik funkcionális alegysége, a poszterior szignalizációs központ (posterior signaling center, a későbbiekben PSC) szabályozza (Lebestky és mtsai., 2003; Krzemien és mtsai., 2007; Mandal és mtsai., 2007; **7. Ábra**). A PSC az elsődleges lebeny poszterior csúcsán



helyezkedik el, és a teljes lárvális fejlődés során néhány tíz sejt alkotja. Ezek a sejtek nyúlványokat bocsátanak a medulláris zónába, melyekkel szignálmolekulákat juttatnak az ott található prohemocitákhoz (Mandal és mtsai., 2007; **7. Ábra**). Ilyen

szignálmolekula a Hedgehog fehérje, amely a medulláris zóna sejtjeinek prohemocita állapotát tartja fenn (Mandal és mtsai., 2007). A PSC sejtjei Serrate fehérjét is termelnek, és azt a medulláris zóna felé szekretálják, ahol az a sejtekben a Notch receptoron keresztül olyan jelátviteli útvonalakat aktivál, melyek a vérsejtek differenciálódását gátolják (Lebestky és mtsai., 2003).

A PSC sejtjeinek identitását az Antennapedia fehérje határozza meg, amely a központi nyirokszerv-primordiumon belül kizárólag ebben a sejtcsoportban fejeződik ki (Mandal és mtsai., 2007). Ugyanezen sejtekben termelődik a Collier (Col) fehérje is, ami az emlősök korai B-sejt faktorának (EBF) *Drosophila* homológja (Crozatier és mtsai., 2004). Michele Crozatier és munkacsoportja részletesen foglalkozott a Col szerepével a központi nyirokszervben, és megállapították, hogy hiányában a PSC sejtek elveszítik identitásukat, ami a központi nyirokszerv sejtjeinek korai differenciálódásához vezet. Ennek az a következménye, hogy *col* mutáns egyedekben az immunindukciót követően a központi nyirokszerv nem vesz részt a lamellocita differenciálódásban (Krzemien és mtsai., 2007; Krzemien és mtsai., 2010).

#### **1.2.4.3 A lárva vérsejtkompartmentumai - a szesszilis szövet**

A szesszilis vérsejtképző szövet a lárva testüregének falához tapadó, immobilis vérsejtkompartmentum (Lanot és mtsai., 2001; Zettervall és mtsai., 2004; Narita és mtsai., 2004; Márkus és mtsai., 2009). A lárva szegmentált anatómiája miatt a szesszilis szövet sávos mintázatot mutat. Az egyes sávokon belül elkülöníthetünk egy dorzális foltot, és két laterális sávot, melyek sejtszáma poszterior irányba haladva nő (Zettervall és mtsai., 2004; Makhijani és mtsai., 2011). A szövetet alkotó sejtekről leírták, hogy elhelyezkedésük nem véletlenszerű, hanem a környéki idegrendszer sejtjei köré csoportosulnak. Ez az elrendeződés neuronális jelemolekulák hatására

alakul ki, és a környéki idegrendszeri fenotípust okozó *atonal*<sup>1</sup> mutáció következtében a vad típusban megfigyelt szabályos, sávozott szesszilis kompartmentum nem jön létre (Makhijani és mtsai., 2011).

A szesszilis szövet egy kitüntetett egységének tekinthető a poszterior vérképző szövet (PHT), mely a lárva poszterior szelvényeiben található vérsejtcsoport. Jelenléte már az első stádiumú lárvákban is megfigyelhető (Kurucz és mtsai., 2007b, Márkus és mtsai., 2009). A szesszilis szövet részletes jellemzése során megfigyelték, hogy egyaránt tartalmaz plazmatocitákat, és differenciálódási markereket ki nem fejező sejteket (Márkus és mtsai., 2009). A központi nyirokszerv elkötéssel történő fizikai izolációja bizonyította, hogy a korábbi feltételezésekkel szemben az effektor sejtek nem kizárólag ebből a hematopoietikus kompartmentumból származnak: immunindukciót követően a központi nyirokszervtől elválasztott testrészből is sikerült lamellocitákat izolálni (Márkus és mtsai., 2009). Ez az eredmény, valamint a szesszilis szövet parazitoid darázs általi fertőzést követően megfigyelt leválása arra enged következtetni, hogy a szesszilis szövet is részt vesz a végrehajtó sejtek, köztük a lamellociták differenciálásában (Márkus és mtsai., 2009).

A szesszilis szövet szerkezete rendkívül sérülékeny, és akár finom mechanikai behatások is elegendők ahhoz, hogy sejtek váljanak le belőle (Makhijani és mtsai., 2011). A lárva központi nyirokszervével ellentétben, az immunfluoreszcens festést megelőző boncoláskor ezen szövet szerkezete nagymértékben roncsolódik. Az intakt szesszilis szövet megfigyelésére kizárólag az élő állatban van lehetőség; a vérsejt specifikusan GFP-t kifejező lárvákat ideiglenesen immobilizálva (például hűtéssel) fluoreszcens sztereomikroszkóppal vizsgálható a szesszilis kompartmentum (Stofanko és mtsai., 2008; Márkus és mtsai., 2009). Ez az eljárás azonban nem teszi lehetővé a



részletes, sejttípusokra kiterjedő jellemzést, továbbá korlátozza a vizsgálat felbontását is.

#### **1.2.4.4 Vérsejtkompartmentumok a lárva-báb-adult átalakulás során**

A lárvális fejlődés során mindhárom hematopoietikus kompartmentum vérsejtszáma növekszik, egészen a késői 3. stádiumig (Lanot és mtsai., 2001). A bábozódás korai szakaszában a lárvális szövetek felbomlanak, majd az imaginális szövetek prekursoraiból megkezdődik a kifejlett állat (adult) kialakulása. Az intenzív szöveti átrendeződés során sok apoptotikus sejttermék keletkezik, melyet a vérsejtek fagocitálnak. A bábban éppen ezért valószínűleg nincsenek vérsejtképző szövetek. A bábból kikelő adultokban két immunkompartmentum különíthető el: a keringés és a szesszilis szövet. A keringésben több mint 99 százalékban plazmatociták találhatók, míg kristálysejtek csak elvétve fedezhetők fel (Elrod-Erickson és mtsai., 2000). Ebben a fejlődési stádiumban tokképző sejtet (lamellocitát) mindeddig nem sikerült azonosítani (Lanot és mtsai., 2001).

Az adult szesszilis szövetének mintázata eltér a lárvaétól: a potroh hasi oldalán foltokban, a háti oldalon elszórtan található meg. Az adultok vérsejtjei kevésbé jellemzettek, mindössze néhány funkcionális vizsgálatot közöltek velük kapcsolatban (Elrod-Erickson és mtsai., 2000; Mackenzie és mtsai., 2011; Horn és mtsai., 2014), amelyek arra engednek következtetni, hogy a kifejlett *Drosophilában* csak effektor sejtek találhatók, és nincs aktív vérsejtképződés.

### **1.2.5 A vérsejtképződés vizsgálatának lehetőségei**

#### **1.2.5.1 Vérsejtspecifikus molekulák**

A *Drosophila* vérsejtjeinek elkülönítését és jellemzését nagyban segítette a laboratóriumunkban előállított hemocita specifikus immunológiai markerrendszer (Kurucz és mtsai., 2007b). A markerek segítségével a vérsejtek könnyen azonosíthatóvá váltak mind a vérsejtpreparátumokon, mind pedig a hematopoietikus szövetekben. Négy olyan antigénklasztert azonosítottak, melyek a lárvális vérsejtekre specifikusak. A H antigének minden lárvális hemocitán megtalálhatók. A H2 antigén aminosav szekvenciájának meghatározásával azonosították a Hemese fehérjét, amely egy általánosan elfogadott pán-hemocita marker (Kurucz és mtsai., 2003).

A P antigének kizárólag a plazmatocitákon fejeződnek ki. A P1 antigén azonosítása során kiderült, hogy a fehérje a bekebelezésben játszik szerepet. Laboratóriumunkban ezt a fehérjét NimC1-nek nevezték el (Kurucz és mtsai., 2007a). Újabb vizsgálatokban azt is sikerült kimutatni, hogy a NimC1 fehérje *in vitro* körülmények között baktériumokhoz kötődik (Zsámboki és mtsai., 2013).

Az L antigéneket a vérsejtek közül kizárólag lamellociták fejezik ki. Az L1 antigén egy uPAR domént tartalmazó, egyelőre ismeretlen funkciójú membránkötött fehérje, melynek az Atila nevet adtuk (Kurucz és mtsai., Kézirat). Az L4 markerről megállapítottuk, hogy a *myospheroid* gén által kódolt  $\beta$ -PS integrin (Honti és mtsai., 2014). Az L5 antigén (Filamin 240kD) azonosítása és funkcionális vizsgálata során kiderült, hogy a lamellocita differenciálódás szuppresszora (Rus és mtsai., 2005), feltételezhetően a Jun jelátviteli út effektoraként (Külshammer és Uhrilova, 2012). Az L6 markert felismerő ellenanyag vizsgálatainkban a lamellocitáknak egy olyan alpopulációjával reagált, melyet morfológiai szempontból terminálisan differenciálódottnak tekintünk (Kurucz és mtsai., 2007b).

A C antigének kizárólag a kristálysejtekben fejeződnek ki. A C1 markert felismerő 12F6 monoklonális ellenanyagot Tina Trenczek és munkatársai állították

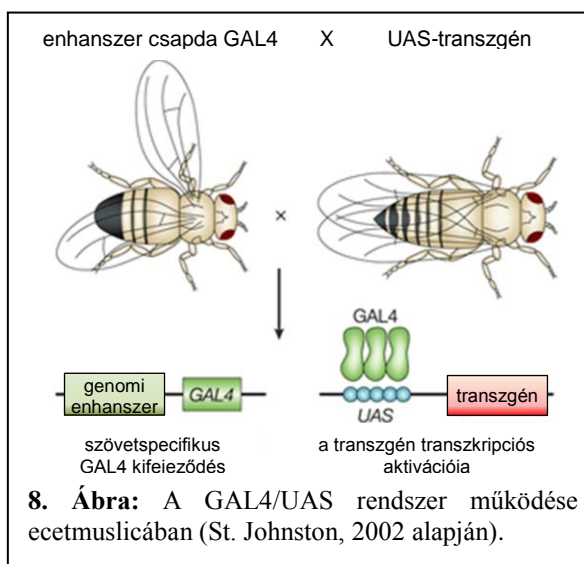
elő (*Manduca sexta* vérsejtekkel szemben), és a kristálysejtekben kifejeződő profenol-oxidáz enzimet ismeri fel (Willott és mtsai., 1994), míg a C4 markert laboratóriumunkban azonosítottuk, és kifejeződését a kristályok felszínén figyeltük meg (Kurucz és mtsai., 2007b). Míg a Hemese antigén minden lárvális vérsejtre jellemző, a NimC1, L1 és C1 sejt típusokra specifikusan, tehát egymást kizárva fejeződik ki (Kurucz és mtsai., 2007b).

Marker	Őssejtek	Fagocitáló sejtek	Lamellociták	Kristálysejtek
<b>Hemese</b>	+/-	+	+	+
<b>NimC1</b>	-	+	-	-
<b>L1-L6</b>	-	-	+	-
<b>C1-C4</b>	-	-	-	+

### 1.2.5.2 *In vivo* riporterek

A vérsejtspecifikus molekuláris markerek génszintű meghatározása lehetőséget nyitott olyan, genetikailag kódolt *in vivo* riporterek létrehozására, melyek vérsejtspecifikusan fejeződnek ki. A mikroszkópos eljárások fejlődésével ezek a riporterek rendkívül fontosnak bizonyultak a vérsejtek élő állatban történő vizsgálatához, valamint a transzgenikus rendszereken alapuló géncsendesítések, illetve túltermelések végzéséhez.

Az ecetmuslica vizsgálatára használt transzgenikus vizsgálati módszerek leggyakrabban a GAL4/UAS rendszeren alapulnak.



Ennek lényege, hogy az élesztőből származó GAL4 transzkripciós faktor az általa felismert UAS szekvenciákhoz kötődik, és az attól 3' irányban elhelyezkedő gén átíródását indukálja. Amennyiben az állat egy szövetspecifikus kifejeződési mintázatú

transzgenikus GAL4 forrást hordoz, úgy az UAS által vezérelt gén is szövetspecifikusan expresszálódik. A GAL4/UAS rendszer egyik nyilvánvaló felhasználási módja a fluoreszcens riporter fehérjék szövetspecifikus kifejeztetése, de gyakran alkalmazzák fehérjék túltermeltetésére, valamint RNS-interferencia alapú géncsendesítésre is (Braun és Perrimon, 1993; Giordano és mtsai., 2002; Duffy, 2002; **8. Ábra**).

A létrehozott GAL4-források közül számos elemet használnak a vérsejtek vizsgálatára. Az összes vérsejttípusban kifejeződik a *Hemese-GAL4* (*He-GAL4*) elem (Zettervall és mtsai., 2004). A plazmatocitákra jellemző kifejeződést tapasztaltak az *eater-GAL4* (Tokusumi és mtsai., 2009), a *Peroxidasin-GAL4* (*Pxn-GAL4*; Stramer és mtsai., 2005) és a *Hemolentin-GAL4* (*Hml-GAL4*; Goto és mtsai., 2003; Sinenko és mtsai., 2005) transzgének esetében. A *misshapen-GAL4* (*msn-GAL4*) meghajtóelem a lamellocitákban fejeződik ki (Tokusumi és mtsai., 2009), míg a *lz-GAL4* (Crew és mtsai., 1997) kifejeződése a kristálysejtekre jellemző.

Több olyan GAL4 forrást azonosítottak, amelyek a vérsejtkompartmentumok közül kizárólag a központi nyirokszervben fejeződnek ki. A medulláris zónát (annak progenitor sejtjeit) kijelölő elemek például a *domeless-GAL4* (*dome-GAL4*; Jung és mtsai., 2005) és a *hand-GAL4* (Albrecht és mtsai., 2006), míg a *Dorothy-GAL4* (*Dot-GAL4*; Kimbrell és mtsai., 2002) a kortikális zóna egy részében fejeződik ki. A *col-GAL4* elem aktivitása az embrionális stádiumokban a teljes központi nyirokszervre kiterjed, azonban a lárvális fejlődési szakaszba lépve a PSC-re korlátozódik (Krzemien és mtsai., 2007). A központi nyirokszervre specifikus elemek kivétel nélkül kifejeződnek a másodlagos lebenyekben is.

A felsorolt GAL4-források egy része az embrionális életszakaszban is kifejeződik (*dome-GAL4*, *Dot-GAL4*, *col-GAL4*). Előállítottak olyan

meghajtóelemeket is, amelyek már a korai embrióban is kijelölnek vérsejteket: a *srp-GAL4* elem (Brückner és mtsai., 2004) minden embrionális vérsejtre jellemző, és kifejeződése megőrződik a lárvális fejlődési szakaszban is, míg a *croquemort-GAL4* (Olofsson és Page, 2005) az embrionális makrofágokra jellemző expressziós mintázatot mutat.

A rendelkezésre álló GAL4 forrásokon kívül azonban meg kell említeni olyan riportergéneket is, amelyeket közvetlenül vérsejtspecifikus regulátorok vezérelnek. Ilyen például az *atilla*, lamellocita-specifikus mintázatban kifejeződő, génben található *Mi[ET1]* transzpozon beépülés. Az elembe található, és a beépülés követésére használt *3XP3-GFP* transzgén az *atilla* gén enhanszereit csapdázza, ezáltal az autonóm kifejeződési mintázata (agy, környéki idegrendszer, bél) mellett a lamellocitákban is megfigyelhetünk GFP expressziót (Honti és mtsai., 2009).

Tokusumi és munkatársai a vérsejt-differenciálódási vizsgálatokat megkönnyítendő létrehoztak egy *in vivo* transzgenikus riporter-panelt. Ehhez három gén szabályozó elemeit izolálták: a plazmatocitákra jellemző *eater*-ét, a kristálysejtekben kifejeződő *Black cells*-ét, valamint a lamellocita-specifikus *msn*-ét. Ezen szabályozó elemekhez *EGFP*, *CFP*, illetve *mCherry* transzgéneket fuzionáltattak, ami lehetővé teszi akár három riporter-transzgén egyidejű vizsgálatát is (Tokusumi és mtsai., 2009).

A GAL4/UAS rendszer - megfelelő kiegészítésekkel - lehetővé teszi teljes leszármazási vonalak követését is. Az *in vivo* sejtvonaltjelölő rendszerek kulcsfontosságú kritériuma a jelölésnek, vagyis a riportergén kifejeződésének az irreverzibilis rögzítése, ami a sejtosztódástól, illetve a génkifejeződési mintázat megváltozásától függetlenül biztosítja az állandó aktivitást.

Ilyen genetikai sejtvonajjelölő rendszert írtak le Ito és munkatársai 1997-ben. Az általuk létrehozott genetikai kombináció a GAL4 forráson és az aktiválható fluoreszcens riporterén (*UAS-GFP*) kívül egy "sejtvonajjelölő" elemet (*Actin-Flip-out-GAL4*, röviden *AFG*), valamint egy, a meghajtóelemmel aktiválható Flip-rekombináz-forrást (*UAS-FLP*) is tartalmaz. A rendszer működési elve szerint a szövetspecifikusan termelődő GAL4 transzkripciós faktor a Flip-rekombináz kódoló transzgén (valamint a *GFP* riportergén) előtti UAS-szakaszhoz kötődik, és így az adott szövetben indukálja annak átíródását. A termelődő FLP enzim az *AFG* elem két megegyező orientációjú, *cis* elhelyezkedésű FRT szakasza között helyspecifikus rekombinációt indukál, ezáltal eltávolítva egy *yellow*<sup>+</sup> (*y*<sup>+</sup>) *STOP* kazettát. A rekombinációs eseményt követően az *AFG* elembe található *actin5C* szabályozó szekvencia a *GAL4* transzgén elé kerül, és konstitutívan indukálja annak kifejeződését. Az ennek következtében termelődő GAL4 transzkripciós faktor konstitutívan aktiválja az UAS-által vezérelt *GFP* riportergént (Ito és mtsai., 1997).

Hasonló elven alapul a G-TRACE jelölőrendszer is, amelyben a FLP-mediált rekombináció egy GAL4 forrástól független, konstitutív expresszióra képes riportergént (*Ubi<sup>p63</sup>-Flip-out-GFP* kazettát) indukál. A rendszer ezen felül tartalmaz egy *UAS-mCherry* transzgént is, ami lehetőséget nyújt a GAL4-forrás aktuális kifejeződésének (piros fluoreszcencia), illetve korábbi, a vizsgálatkor már nem aktív expressziójának (zöld fluoreszcencia) összehasonlítására (Evans és mtsai., 2009).

### **1.2.5.3 Az ecetmuslica vérsejtképzését befolyásoló faktorok**

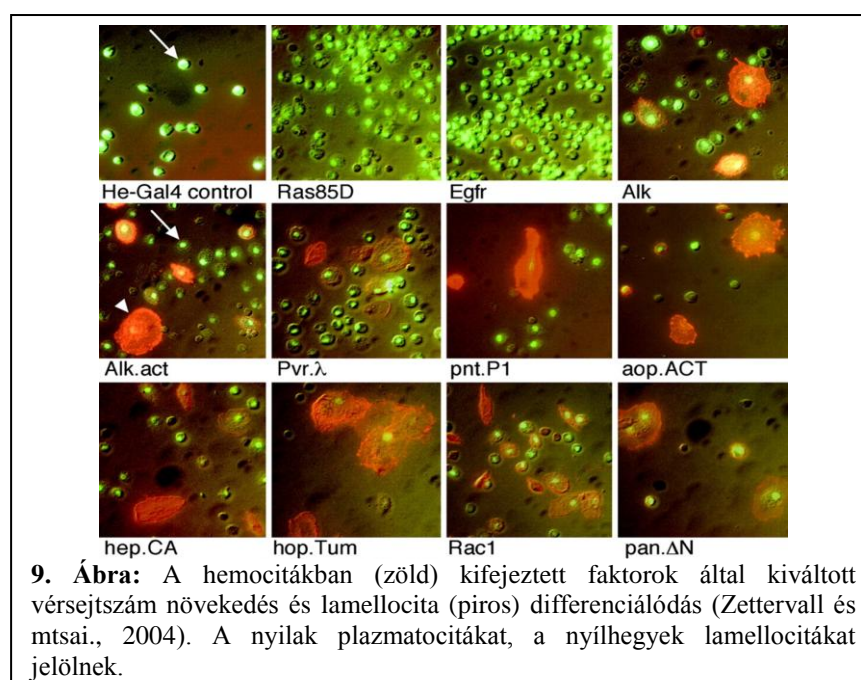
A *Drosophila melanogaster* vérképzését szabályozó faktorok azonosításához nagy segítséget jelentettek azok a régóta rendelkezésre álló mutációk, melyek a hemociták differenciálódására is hatással vannak.

A *Tum<sup>l</sup>* funkciónyeréssel mutációt 1981-ben izolálta William Hanratty, egy tumor-szupresszor mutánsok azonosítására irányuló szűrővizsgálatban (Hanratty és Ryerse, 1981). A *Tum<sup>l</sup>* mutáns további jellemzése során megállapították, hogy hatására a lárva keringésében melanizálódott tumorok találhatók, a keringő vérsejtszám többszörösére emelkedik, valamint spontán lamellocita differenciálódás játszódik le (Silvers és Hanratty, 1984; Hanratty és Dearolf, 1993). Hanratty és Dearolf azt is megállapították, hogy a *Tum<sup>l</sup>* mutáció allélikus a *hopscotch* génnel (Hanratty és Dearolf, 1993). A *hopscotch* (*hop*) gén a *Drosophila* Janus-kinázát (JAK) kódolja, mely a JAK/STAT jelátviteli út tagja, és számos fejlődési folyamathoz elengedhetetlen (Binari és Perrimon, 1994; Fossett, 2013). A vérsejtképzés során a JAK/STAT szignalizációnak kettős szerepe van; egyaránt fontos a vérsejt-differenciálódás aktiválásában (Luo és mtsai., 1995) és szuppresszáálásában (Makki és mtsai., 2010). A *Tum<sup>l</sup>* (*hop<sup>Tum</sup>*) mutációt jelenleg is rutinszerűen használják a vérsejt-differenciálódás vizsgálatához (Bina és mtsai., 2010; Fossett, 2013; Bausek és Zeidler, 2014). A laboratóriumunkban végrehajtott kísérletekhez egy általunk létrehozott, homozigóta életképes *hop<sup>Tum</sup>* mutáns vonalat használunk.

Elisabeth Gateff 1977-ban hozta létre az *lethal(3)malignant blood neoplasm<sup>l</sup>* (*l(3)mbn<sup>l</sup>*) funkcióvesztéssel mutációt (Shrestha és Gateff, 1986). A kódoló gén jellemzése során megállapították, hogy az emberi citokeratinokhoz hasonló ismétlődéseket tartalmaz (Konrad és mtsai., 1994). Az *l(3)mbn<sup>l</sup>* mutáció homozigóta formában a lárva stádium megnyúlásához, majd bábállapotban letalitáshoz vezet (Shrestha és Gateff, 1986; Konrad és mtsai., 1994). A mutáns lárvában nagyméretű, vérsejtekből álló melanizált tumorok figyelhetők meg. A keringő sejtek száma több nagyságrenddel magasabb, mint a vad típusú lárvákban, és nagy számban differenciálódnak lamellociták is (Konrad és mtsai., 1994). Ezen tulajdonságai miatt

az *l(3)mbn<sup>l</sup>* mutáns rendkívül hasznosnak bizonyul, amikor a kísérletek során nagyszámú vérsejtre, vagy lamellocitára van szükség (Kurucz és mtsai., 2007b, Honti és mtsai., 2009)

A transzgenikus rendszerek (például GAL4/UAS) térnyerésével lehetőség nyílt arra, hogy a korábban már vizsgált mutáns alléleket vérsejtspecifikusan kifejeztessék. A Dan Hultmark laboratóriumában 2004-ben elvégzett vizsgálat során számos ilyen faktort vizsgáltak a vérsejtspecifikus *Hemese-GAL4* forrással túltermeltetve (Zettervall és mtsai., 2004). Az egyik vizsgált faktor, az *anaplastic lymphoma kinase* gén *Drosophila* ortológjának (*dAlk*) konstitutívan aktív formája volt (*UAS-Alk.act*). Az Alk jelátviteli út aktivitása *Drosophilában* a bélrendszer, az izmok, valamint az idegrendszer fejlődéséhez szükséges (Lorén és mtsai., 2003; Lee és mtsai., 2003), túlműködése mind emlősökben (Morris és mtsai., 1994; Wellmann és mtsai., 1997), mind ecetmuslicában (Lorén és mtsai., 2001; Chand és mtsai., 2013) sejtburjánzáshoz és tumorok kialakulásához vezet. Az ecetmuslica vérsejtjeiben az Alk konstitutívan aktív formájának túltermelése a vérsejtszám növekedését és lamellociták megjelenését indukálta (Zettervall és mtsai., 2004; **9. Ábra**).





Ugyanebben a munkában vizsgálták a *hemipterous* (*hep*) gén funkcionyeréses allélját is (*UAS-hep.ca*). A Hemipterous az emlősök MKK7 fehérjéjének *Drosophila* homológja, a Jun szignáltranszdukciós kaszkád egyik eleme (Jun-kináz-kináz). Az ecetmuslicában a Jun jelátviteli út fontos szerepet játszik az embrionális fejlődésben (Sluss és Davis, 1997), a stressz-válaszban (Wang és mtsai., 2003), valamint az apoptózis szabályozásában (Adachi-Yamada és mtsai., 1999; Moreno és mtsai., 2002). Ez a jelátviteli út szükséges a lamellociták képződéséhez is (Tokusumi és mtsai., 2009); a Hep konstitutívan aktív formájának vérsejtspecifikus túltermeltetése lamellocita differenciálódást indukál (Zettervall és mtsai., 2004).

Hasonló megközelítést – a GAL4/UAS rendszert - alkalmazva Martin Stofanko és munkatársai nagyléptékű szűrővizsgálatot végeztek, amelynek során számos olyan faktort azonosítottak, amelyek a lárva szesszilis vérsejtképző szövetének szerkezetét befolyásolják (Stofanko és mtsai., 2008). Az egyik általuk azonosított jelölt a *charlatan* (*chn*) gén volt. A Charlatan fehérje az ecetmuslica CoRest epigenetikus represszor-komplexének egy tagja. Azt feltételezik róla, hogy olyan gének szabályozásában vesz részt, amelyek a lamellocita-képződés terminális lépéseire szükségesek (Stofanko és mtsai., 2010).

## 2. Célkitűzések

Kísérleteink során a következő célokat tűztük ki:

- 1.) Azonosítani azokat a fő vérsejtleszármazási vonalakat a *Drosophila* embrióban, amelyek részt vesznek a lárvális és adult vérsejtek kialakításában.
- 2.) Kapcsolatot találni ezen sejtvonalak, valamint a lárvális és adult vérsejtkompartmentumok között.
- 3.) Felderíteni az immunválasz során differenciálódó végrehajtó sejtek kompartmentális eredetét.
- 4.) Felderíteni az egyes vérsejtvonalak differenciálódási plaszticitását, és azonosítani a plaszticitásért felelős szabályozó faktorokat.
- 5.) Létrehozni egy olyan kísérleti rendszert, melynek segítségével a szesszilis vérsejtképző kompartmentum részletes szerkezeti analízise *in vivo* lehetővé válik, és ennek segítségével jellemezni a szesszilis szövetet alkotó vérsejttípusokat.

## 3. Anyagok és módszerek

### 3.1 Drosophila törzsek:

*Ore-R*: Oregon-R (vad típus)

*Hml>GFP*:  $w^{1118}$ ; *HmlΔ-GAL4,UAS-2xEGFP* (Sinenko és mtsai., 2004)

*Hml>GFP<sup>TURBO</sup>*:  $w^{1118}$ ; *HmlΔ-GAL4,UAS-2xEGFP*; *HmlΔ-GAL4,UAS-2xEGFP*

*UAS-FLP*:  $y,w,UAS-FLP$  (Exelixis)

*AFG-UAS-GFP*:  $w$ ; *Act5C-FRT-y<sup>+</sup>-FRT-GAL4,UAS-GFP*

*UAS-2xEGFP*:  $y,w$ ; *UAS-2xEGFP*

*Dot-GAL4*:  $w$ ; *Dot-GAL4* (Kimbrell és mtsai., 2002)

*crq-GAL4*:  $w$ ; *crq-GAL4* (Olofsson és Page, 2005)

*lz-GAL4*:  $w$ , *P{GawB}<sup>lz</sup>* (Crew és mtsai., 1997)

*Pxn-GAL4*:  $w$ ; *Pxn-GAL4* (Stramer és mtsai., 2005)

*eater-GAL4*:  $w$ ; *eater-GAL4* (Tokusumi és mtsai., 2009)

*R3-Hml>GFP*:  $w^{1118}$ ; *HmlΔ-GAL4,NimC1+,UAS-2xEGFP* (Honti és mtsai., 2013)

*UAS-hep*:  $w$ ; *UAS-hep.ca*

*UAS-Alk*:  $w$ ; *UAS-Alk.ACT*

*UAS-chn*:  $w$ ; *P{EP}<sup>chn</sup>*

*Hml>GFP*; *l(3)mbn<sup>1</sup>/TM6*: *HmlΔ-GAL4,UAS-2xEGFP*; *l(3)mbn<sup>1</sup> / TM6, Tb*

*atilla<sup>minos</sup>*; *l(3)mbn<sup>1</sup>/TM6*: *Mi{ET1}atilla<sup>MB05359</sup>*; *l(3)mbn<sup>1</sup> / TM6, Tb*

### 3.2 Anyagok:

*Drosophila* Ringer oldat: 7,5g NaCl, 0,35g KCl, 0,21g CaCl<sub>2</sub>, 1000ml dH<sub>2</sub>O, pH 7,0

**PBS:** 0,13M NaCl, 7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4

**Fedő médium:** 3,6 ml 1M Tris (pH 8,6), 9 ml glicerol, 26,4 ml dH<sub>2</sub>O

**Dermedő fedő médium:** Fluoromount G (SouthernBiotech)

**PTU:** 1-fenil-2-tiourea (Sigma)

**BrdU:** 5-bromo-2-deoxyuridine (Sigma)

**DAPI:** 4',6'-diamidino-2-phenylindole (3mg/ml) (Sigma)

**Dichlorvos:** 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate (Fluka)

### **3.3 Ellenanyagok:**

Hemese specifikus: 1.2/1 (Kurucz és mtsai, 2003)

L1 specifikus: H10/9, 7A6 és 29D4 keveréke (Kurucz és mtsai, 2007b)

L2 specifikus: 31A4 (Kurucz és mtsai, 2007b)

L4 specifikus: 1F12 (Kurucz és mtsai, 2007b)

L6 specifikus: H3/E4 (Kurucz és mtsai, 2007b)

H3 specifikus: 4A12 (Kurucz és mtsai, 2007b)

NimC1 specifikus: N1 és N47 keveréke (Kurucz és mtsai, 2007)

C1 specifikus: 12F6 (Willott és mtsai., 1994)

Alexa-488 konjugált anti-egér-Ig (1:1000) (Invitrogen Mol. Probes)

Alexa-568 konjugált anti-egér-Ig (1:1000) (Invitrogen Mol. Probes)

Alexa-633 konjugált anti-egér-Ig (1:1000) (Invitrogen Mol. Probes)

CF-568 konjugált anti-egér-Ig (1:1000) (Sigma)

### **3.4 Módszerek:**

#### **3.4.1 Ecetmuslica lárvák immunindukálása**

A lárvák immunindukációjához a *Leptopilina bouleari* parazitoid darázsfa G486-os törzsét használtuk. A sejtvonajjelöléses kísérletekben másodík stádiumú lárvákhoz (50 egyed) 5 nőstény darázsát tettünk, és a fiolákat 18°C hőmérsékleten egy éjszakán át inkubáltuk, majd 72 órával a fertőzést követően vizsgáltuk a vérsejteket (Russo és mtsai., 1996). A lamellocita-differenciálódás kinetikájának meghatározásához *Ore-R* legyeket két órán át petéztettünk, majd 72 óra múlva fertőztük darázzsal (2 órán keresztül). A keringő vérsejteket a fertőzés középidejétől számítva 1, 3, 5, 8, 12, 16, 24, 48 és 72 óra után izoláltuk, minden időpontban fertőzetlen kontrollok mellett.

#### **3.4.2 Vérsejtpreparátumok készítése**

*Lárvából:*

12 lyukú Hendley-Essex tárgylemezre lyukanként 30µl, PTU-t tartalmazó Ringer oldatott cseppentettünk. A lárvákat csipesszel a cseppekben tartva, kutikulájukat feltéptük, és enyhe rázogatóssal kimostuk a vérsejteket.

*Kifejlett egyedekből:*

Az étterrel elaltatott adultok potrohának utolsó szelvényét sebészeti mikroolló segítségével eltávolítottuk. Az állat torát élezett üvegapillárisal megszúrtuk, és a kapillárison keresztül PTU-t tartalmazó Ringer-oldattal perfúziót hajtottunk végre.

A cseppben lévő sejteket 12 lyukú tárgylemezen (Hendley-Essex HM-101) tapasztottuk ki 45 percig szobahőmérsékleten, nedves kamrában, ezután a cseppeket

eltávolítva a mintákat acetonnal 6 percig fixáltuk azokban az esetekben, ahol a vérsejtek nem fejeztek ki fluoreszcens riportert. A GFP-t kifejező sejtek fixálása 12 perces, 2%-os paraformaldehides (PBS-ben) kezeléssel történt.

### **3.4.3 Kutikula-preparátumok készítése**

A lárvákat minutia-tűk segítségével a boncasztalhoz rögzítettük, PTU-t tartalmazó Ringer oldatot cseppentettünk rájuk, majd csipeszek segítségével poszterior-anterior irányba felnyitottuk a kutikulát. A felnyitott kutikulát további minutia-tűkkel rögzítettük. A bélrendszer és a zsírtest eltávolítását követően a preparátumot 2%-os paraformaldehiddel (PBS-ben) fixáltuk 12 percig.

### **3.4.4 Immunfluoreszcencia**

A fixálást követően a mintákat 0,1% BSA (marha-szérumalbumin, PBS-ben oldva) segítségével telítettük, majd a mintákat egy órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk az elsődleges ellenanyaggal. Az inkubációt követően a mintát 5 percig mostuk PBS-sel, három alkalommal, majd a másodlagos (az első ellenanyagot felismerő, fluoreszcens festékkel jelölt) ellenanyaggal, valamint a sejtmagokat kiejelő DAPI-val (1:400, Sigma) inkubáltuk a mintákat nedves kamrában, szobahőmérsékleten, 45 percig. Ezután fedőmédiummal (Fluoromount-G, SouthernBiotech) fedtük a mintát.

### **3.4.5 Preparált vérsejtek fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata**

A vérsejtpreparátumokat Zeiss Axioskope 2 MOT fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A felvételek elkészítéséhez az Axiovision 2.4 programot használtuk. A

fluoreszcens színcsatornákat Adobe Photoshop képkezelő szoftverrel illesztettük egymásra.

A konfokális felvételeket Olympus FV 1000 laser-scanning konfokális mikroszkóppal készítettük.

#### **3.4.6 *Drosophila* embriók videómikroszkópiája**

Az embriók dekorionizálást 50 százalékos hipóval (Clorox) végeztük. A dekorionizálást követően üvegaljú Petri-csészke helyezettük az embriókat, melyeket ezt követően bevontunk 10S Voltalef olajjal (VWR). A mikroszkópos felvételeket Olympus cell<sup>^</sup>R konfokális mikroszkóppal készítettük. A kapott képeket ImageJ programmal illesztettük egymásra, a kompozit képekből pedig videó fájlokat készítettünk (Jankovics és Brunner 2006).

#### **3.4.7 A fagocitózis vizsgálata**

A vizsgálathoz hővel elölt, TRITC-cel konjugált *Escherichia coli* baktériumokat állítottunk elő, Hedengren és mtsai. 1999-ben leírt módszere alapján (Hedengren és mtsai., 1999). A lárvákat a kísérleti elrendezéstől függően az immunindukció után 15, 23, illetve 71 órával a jelölt baktériumokkal injektáltuk, majd egy óra múlva felboncoltuk (Kurucz et al., 2007a). A keringő vérsejteket az injektálás után egy órával izoláltuk.

#### **3.4.8 A lárvák immobilizálása**

A lárvákat 25 °C hőmérsékleten 5 percre 25ul - Dichlorvos-t tartalmazó (Fluka, 1:1000 hígítás) - *Drosophila* Ringer oldatba helyezettük, majd speciális, üvegaljú műanyag Petri csészékbe vittük át (Cell E&G). Hogy a lárvák mozgását

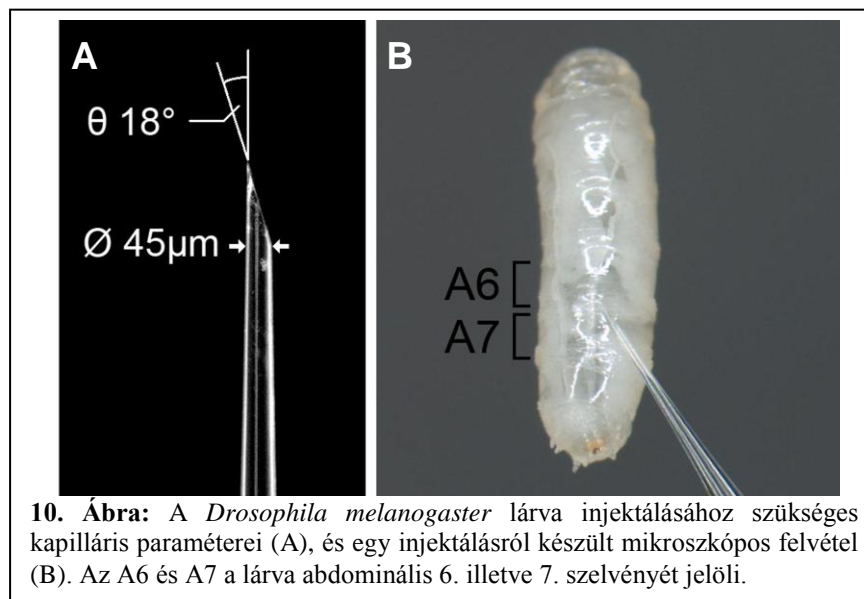
minimalizáljuk, a Petri-csésze alját képező fedőlemezt ragasztóval vontuk be. A ragasztót egy 1m hosszú kétoldalú ragasztó csíkról (3M) oldottuk le 80ml heptánban, majd a szalagot eltávolítottuk. A Petri-csészék előkészítésekor ezt a ragasztót rétegeztük és szárítottuk az üvegfelületre. Annak érdekében, hogy a kitapasztott lárvák ne száradjanak ki, Voltalef 10S olajat (VWR) pipettáztunk rájuk.

#### 3.4.9 Ellenanyagok előkészítése az *in situ* immunfestéshez

Az anti-Hemese (1.2), anti-NimC1 (N1+N47), valamint anti CD45 (T2/48, negatív kontroll) monoklonális hibridóma felülűszókhoz másodlagos ellenanyagot (anti-egér Alexa-633 konjugátum) adtunk, 1:1000 véghígításban. A *Drosophila* specifikus ellenanyag-keverékek előállításához a keveréket 10 percig inkubáltuk 25°C-on.

#### 3.4.10 Ellenanyagok injektálása *Drosophila* lárvákba

A harmadik stádiumú lárvákat *Drosophila* Ringer oldattal mostuk, majd papírvattával szárítottuk. Élezett üvegapilláris segítségével 1 µl ellenanyagkeveréket injektáltunk a lárvákba az A6-A7 szelvények közé (10. Ábra).





#### **3.4.11 *In situ* konfokális mikroszkópia és videómikroszkópia**

A lárvák *in vivo* vizsgálatát Leica TCS SP5 II konfokális mikroszkóppal végeztük. A kompozit képek előállításához 15 szeletet rétegeztünk egymásra az ImageJ szoftverrel (maximum intensity stacking). A videómikroszkópiához 5 szeletet rétegeztünk egymásra minden képkockához. A képkockákat 5 kép/másodperc sebességgel fűztünk össze az ImageJ program segítségével.

#### **3.4.12 Keringő vérsejtek immunfluoreszcens festése ellenanyag-keverékekkel**

Hibridóma-felülűszókból (1.2, N1+N47 illetve T2/48) és másodlagos ellenanyagból (anti-egér CF-568 konjugátum, Sigma-Aldrich) 1000:1 arányú keveréket állítottunk elő, majd 5 percig szobahőn inkubáltuk. Az előkészített vérsejtpreparátumot egy óráig inkubáltuk a keverékkel, majd háromszor 5 percig mostuk PBS-sel. A sejtmagokat DAPI-val jelöltük ki (Sigma-Aldrich). A mintákat dermedő fedő médiummal fedtük (Fluoromount-G, SouthernBiotech), és a **3.4.5** fejezetben leírtaknak megfelelően vizsgáltuk.

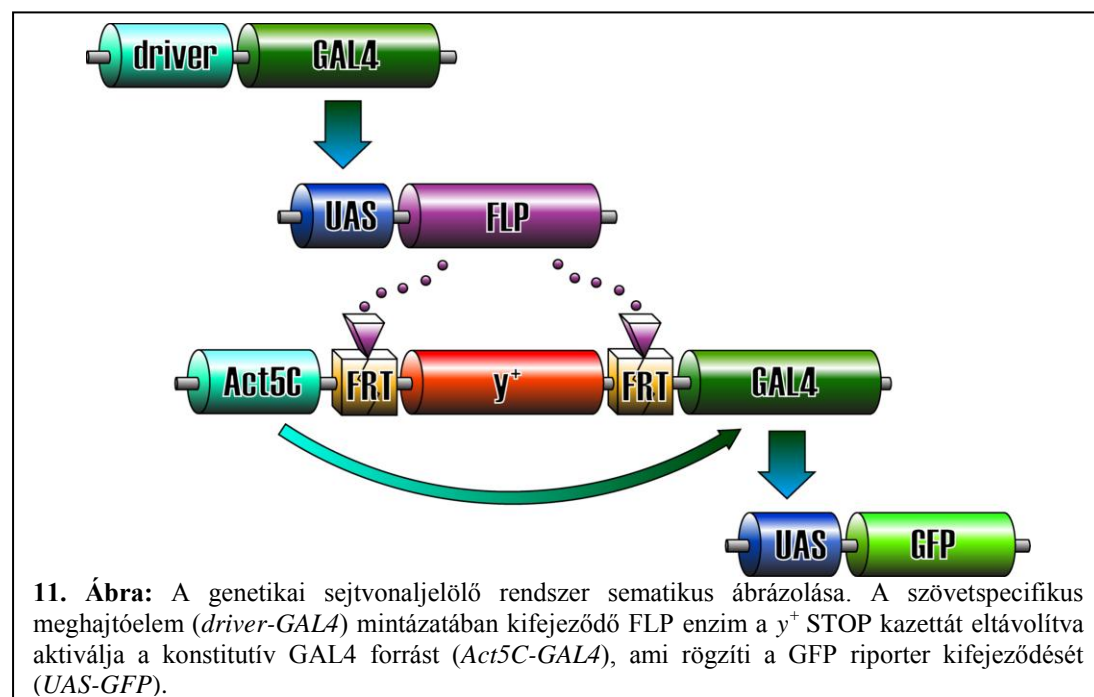
## 4. Eredmények

### 4.1 A vérsejtkompartmentumok embrionális eredete

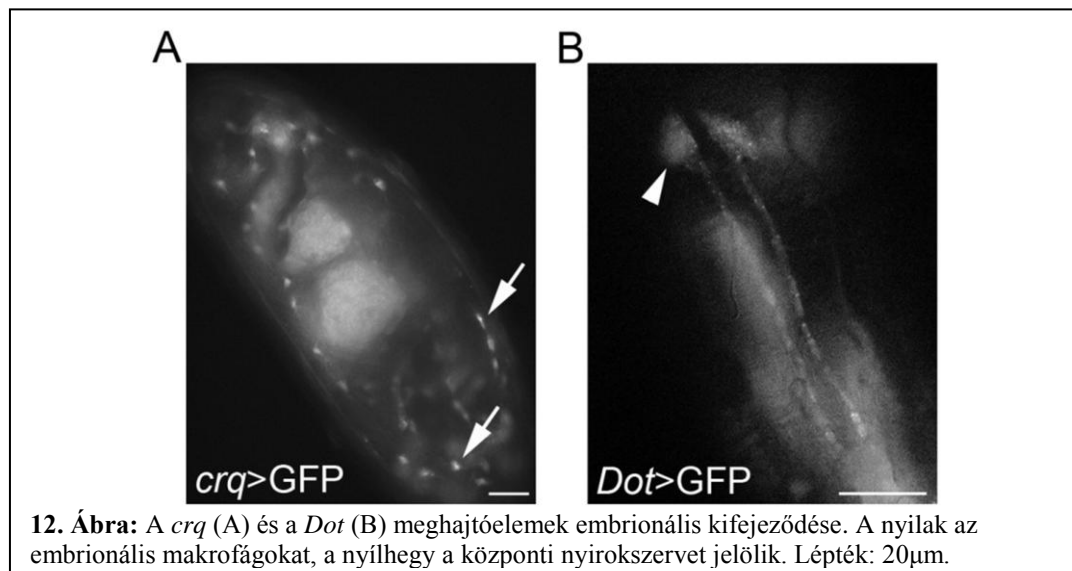
Annak érdekében, hogy az embrionális vérsejtleszármazási vonalakat a későbbi fejlődési stádiumokban követhessük, létrehoztunk egy vérsejt vonalak *in vivo* jelölésére alkalmas rendszert, amely megfelel a következő kritériumoknak:

- a rendszer a vérsejtleszármazási vonalakra nézve specifikus
- tartalmaz egy - akár az élő állatban is követhető- fluoreszcens riportert
- az aktivációját követően a génexpressziós változásoktól függetlenül, konstitutívan működik
- lehetőséget biztosít egyéb transzgenikus elemek aktiválására is

A felsorolt feltételeket figyelembe véve az Ito és munkatársai által leírt genetikai sejtvonaljelölő rendszert alkalmaztuk (Ito és mtsai., 1997; **11. Ábra**).



A sejtvonajelölő rendszer működtetéséhez szükség volt szövetspecifikus aktivitású GAL4 elemekre. A megfelelő elemek kiválasztásánál fontos szempontként vettük figyelembe, hogy egymástól független embrionális vérsejtleszármazási vonalakat tudjuk kijelölni, és a kijelölt populációk között ne legyen átfedés. Ezért az irodalmi adatok alapján kiválasztott, vérsejtekben aktív *GAL4* meghajtó elemet hordozó *Drosophila* vonalakat UAS-2xEGFP egyedekkel keresztezve vizsgáltuk a riporterek kifejeződését. Előzetes fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok után két elemet, a *crq-GAL4*-et és a *Dot-GAL4*-et jellemeztük részletesen. Az irodalmi leírásoknak megfelelően a *crq-GAL4* kifejeződését az embrionális makrofágokban figyeltük meg (Olofsson és Page, 2005). A *Dot-GAL4* esetében szintén a hivatkozásoknak megfelelő expressziós mintázatot tapasztaltunk, ebben az esetben az embrió központi nyirokszervében, valamint a környéki idegrendszerben, a tracheolákban, valamint egyes bélszakaszokban (Kimbrell és mtsai., 2002).



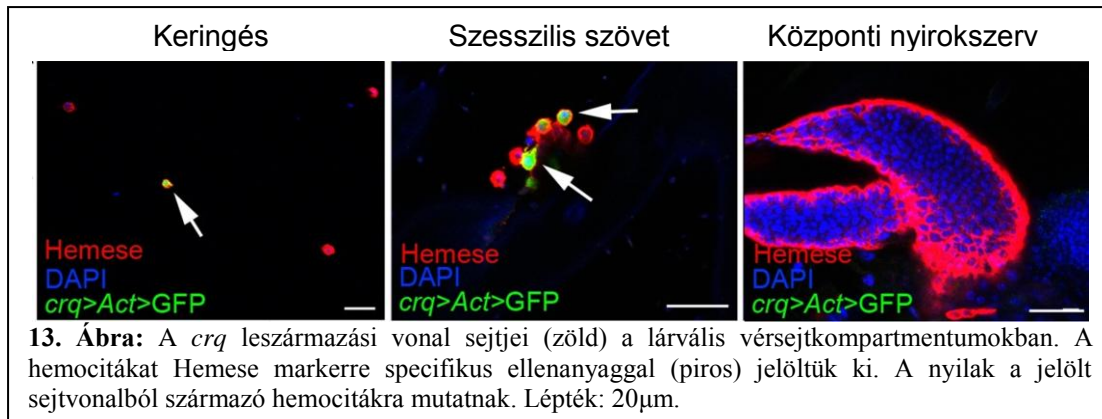
Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a két meghajtóelem kifejeződési mintázata nem fed át egymással, konfokális videómikroszkópia segítségével vizsgáltuk a *crq-GAL4/UAS-2xEGFP* és *Dot-GAL4/UAS-2xEGFP*

állatok riporter expresszióját az embrionális fejlődés során. A felvételeken megfigyeltük, hogy a *crq-GAL4*-et kifejező vérsejtpopuláció a fejlődés során az embrionális makrofágokra jellemző vándorláson esik át, ugyanakkor nem figyeltünk meg GFP jelet az embrió központi nyirokszervében. Ezzel szemben a *Dot-GAL4/UAS-2xEGFP* embriókban kizárólag a néhány sejtől felépülő embrionális központi nyirokszervben azonosítottunk GFP pozitív hemocitákat, melyek a fejlődő szívcső anterior végének két oldalán helyezkedtek el, két csomót alkotva.

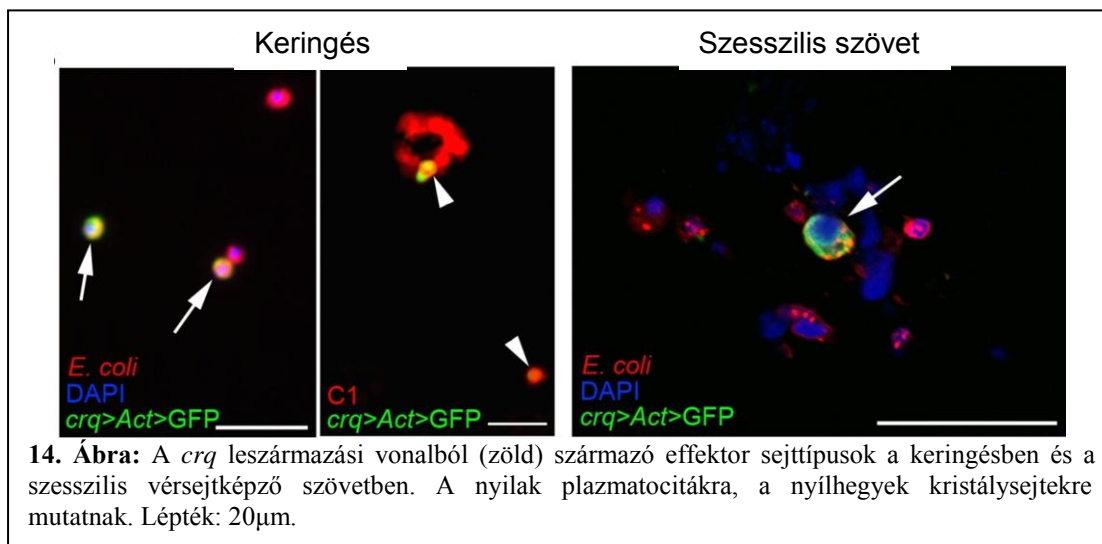
A sejtvonaljelölő vizsgálatokat megkönnyítendő előzetesen létrehoztunk egy *y, w, UAS-FLP; AFG, UAS-GFP* homozigóta törzset, amely meghajtóelem nélkül a tracheákhoz asszociálódó, nagyméretű sejtekben mutat háttéraktivitást, azonban a vérsejtekben egyszer sem tapasztaltunk spontán GFP kifejeződést. A törzs számos generáción keresztüli fenntartása azt is bizonyította, hogy a jelölő elem aktivitását biztosító *cis*-rekombinációs esemény a csíravonalban spontán nem következik be.

Az elkészített segédtörzsből származó szüzeket homozigóta *crq-GAL4* és *Dot-GAL4* hímekkel keresztezve olyan lárvákat kaptunk, melyek embrionális vérsejtvonalai jelölődtek, így ezeket a lárvális stádiumban vizsgálhattuk.

Az embrionális makrofág leszármazási-vonalat (*crq*-vonal) követve megállapítottuk, hogy az abból származó sejtek a lárva keringésében és szesszilis szövetében egyaránt megtalálhatóak. A lárva központi nyirokszervében azonban nem találtunk GFP pozitív sejteket, amiből arra következtettünk, hogy az embrionális makrofág-vonal a központi nyirokszerv kialakításában a lárvális stádiumok során sem vesz részt (**13. Ábra**).

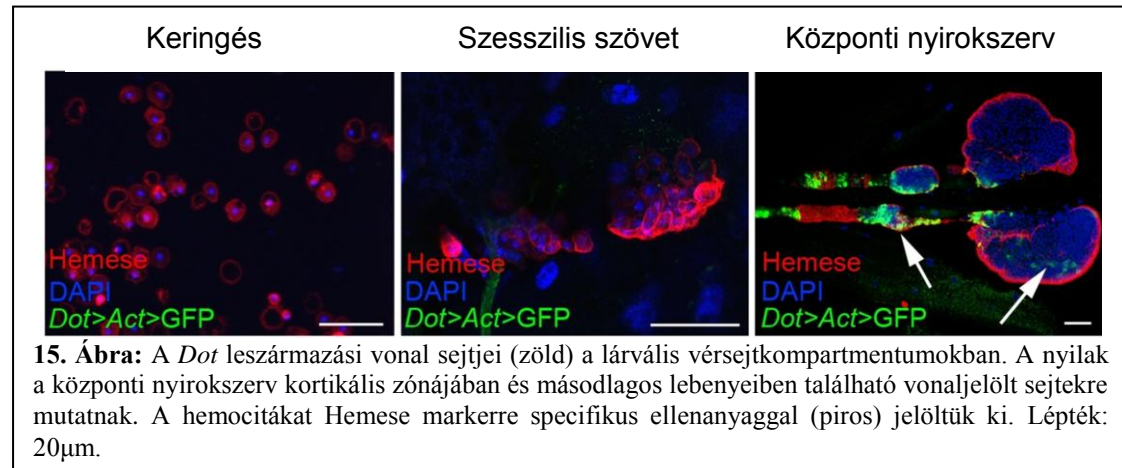


Megvizsgáltuk a *crq*-vonalból származó effektor sejttypusokat is. A plazmatocitákat bekebelező képességük alapján jelöltük ki: a vonaljelölt lárvákat hővel elölt, TRITC konjugált *E. coli* baktérium szuszpenzióval injektáltuk, majd egy óra elteltével vérsejteket izoláltunk belőlük. A kristálysejtek azonosítására a profenoxidázt felismerő C1 ellenanyagot alkalmaztuk. Megállapítottuk, hogy mind plazmatociták (fagocitáló sejtek), mind kristálysejtek (C1 markert kifejező hemociták) megtalálhatók a GFP pozitív sejtek között (14. **Ábra**).



Az embrionális központi nyirokszerv leszármazási vonal (*Dot*-sejtvonal) vizsgálata a lárvában megerősítette a *crq*-sejtvonaljelöléssel kapott eredményeinket: a jelölt sejtek kizárólag a lárva központi nyirokszervének kortikális zónájában, a poszterior szignalizációs központban, valamint a másodlagos lebenyekben és az

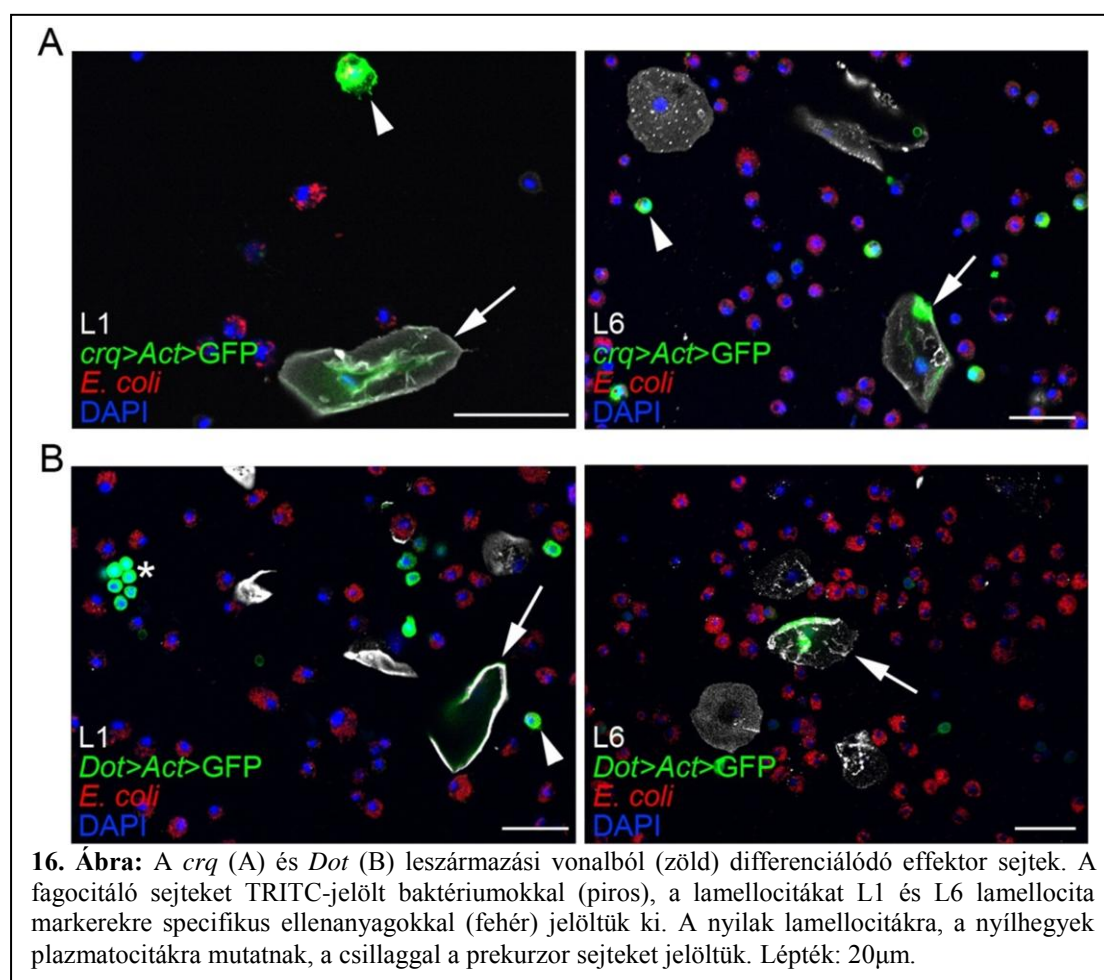
azokat egymástól elválasztó perikardiális sejtekben fordultak elő. Jelölt sejteket sem a keringésben, sem a szesszilis szövetben nem találtunk (**15. Ábra**). Ezen eredmények fényében megállapítható, hogy a központi nyirokszerv a többi vérsejtkompartmentumtól elszigetelten fejlődik.



Annak érdekében, hogy megértsük a kompartmentumok szerepét az immunindukció során lejátszódó védelmi reakcióban, *Leptopilina bouhardi* parazitoid fürkészdarazsakkal fertőztünk második stádiumú *crq*-, valamint *Dot*-sejtvonaljelölt lárvákat, majd 72 órával a fertőzést követően megvizsgáltuk keringő vérsejtjeiket. A *crq*-sejtvonaljelölt állatokban megfigyeltünk GFP-t kifejező tokképző sejteket (lamellocitákat), amelyek kifejezték az L1 és L6 lamellocita specifikus markereket; amiből arra következtettünk, hogy az embrionális makrofág sejtvonal részt vesz ezen specializált sejttípus képzésében, tehát a tokképző sejtek nem kizárólagosan a központi nyirokszervből származnak (**16. Ábra, A**).

A parazitált *Dot*-sejtvonaljelölt lárvák keringésében - a naív állatban tapasztaltakkal ellentétben - jelen voltak GFP pozitív vonaljelölt sejtek, melyek közt megfigyeltünk fagocitáló plazmatocitákat, valamint kisméretű, a pán-hemocita Hemese markert kifejező, azonban minden specifikus markerre nézve negatív, nem fagocitáló sejteket, amelyekről feltételezzük, hogy a központi nyirokszervből

származó prekursor sejtek. Mindezek mellett a GFP pozitív keringő sejtpopulációban azonosítottunk L1 és L6 markereket kifejező lamellocitákat is (16. Ábra, B). Ezek alapján megállapítottuk, hogy a központi nyirokszerv ugyan az állat zavartalan fejlődése során nem vesz részt a keringő sejtek képzésében, azonban immunindukciót követően a szerkezete felbomlik, és a kortikális zónában képződő effektor sejtek bejutnak a lárvák hemolimfájába.



## 4.2 A lárvá vérsejtjeinek plaszticitása

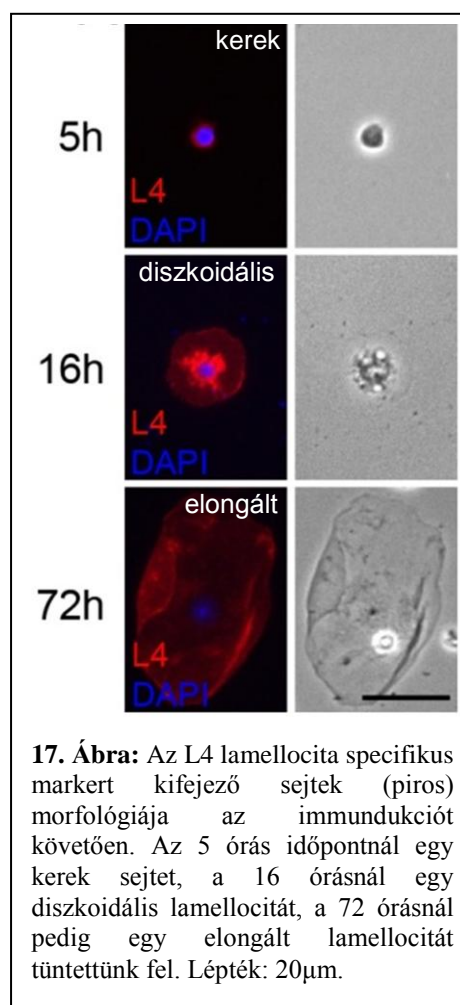
Kísérleteinkből egyértelműen kiderült, hogy lamellociták a központi nyirokszerven kívül is differenciálódnak. Mivel a keringésben és a szesszilis szövetben mindeddig nem sikerült kimutatni olyan vérsejteket, melyeket funkció, morfológia vagy marker-kifejeződés szempontjából progenitor hemocitáknak

nevezhetnénk, feltételeztük, hogy a lamellociták effektor irányba elkötelezett sejtekből is kialakulhatnak. Ezért megvizsgáltuk a naív lárvákban is differenciálódó plazmatociták, illetve és kristálysejtek plaszticitását – a lamellocita irányba történő átalakulásra való képességét.

#### 4.2.1 A plazmatociták plaszticitása

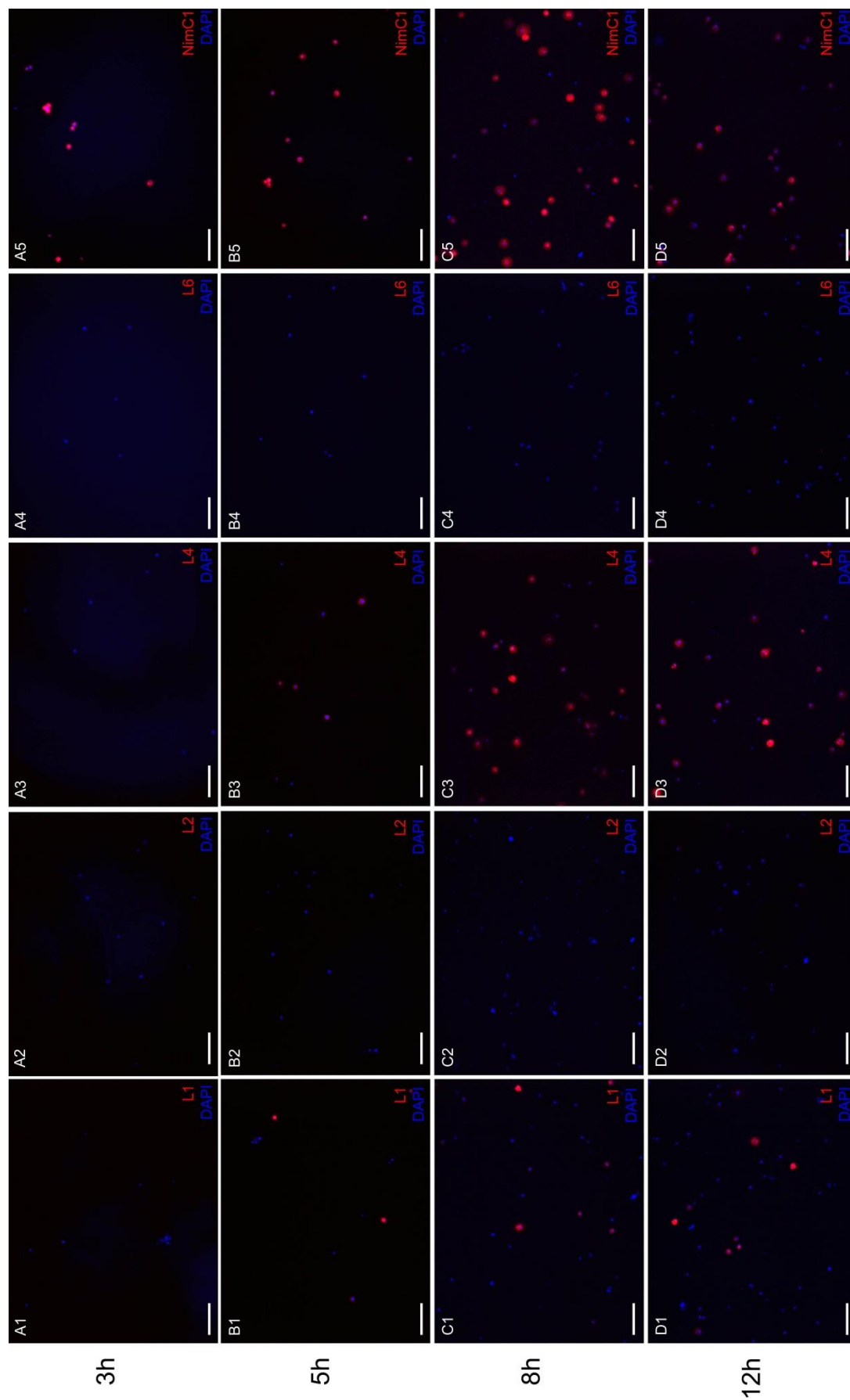
A parazitoid darázs általi indukcióra bekövetkező lamellocita differenciálódás vizsgálata során megfigyeltük, hogy immunindukált, plazmatocita-specifikus riportert (*Hml>GFP*) kifejező lárvákból származó vérsajtpreparátumokban a lamellocita-markereket expresszáló sejtek egy része halvány GFP fluoreszcenciát mutat. Mivel ez az *in vivo* marker az érett lamellocitákban nem fejeződik ki, feltételeztük, hogy a megfigyelt sejtek olyan előalakokból differenciálódtak, melyekben a GFP expresszió aktív volt, majd lecsengett.

Annak érdekében, hogy a tokképző sejtek differenciálódását részleteiben is megértsük, funkcionális és markerkifejeződési vizsgálatokat végeztünk immunindukált lárvákban. A kísérletekhez négy lamellocita-specifikus (L1, L2, L4, L6), valamint egy plazmatocita-specifikus (NimC1) marker expresszióját követtük végig az immunindukciót követő első 72 órában. Szinkronizált, második stádiumú *Ore-R* lárvákat *Leptopilina boulandi* parazitoid

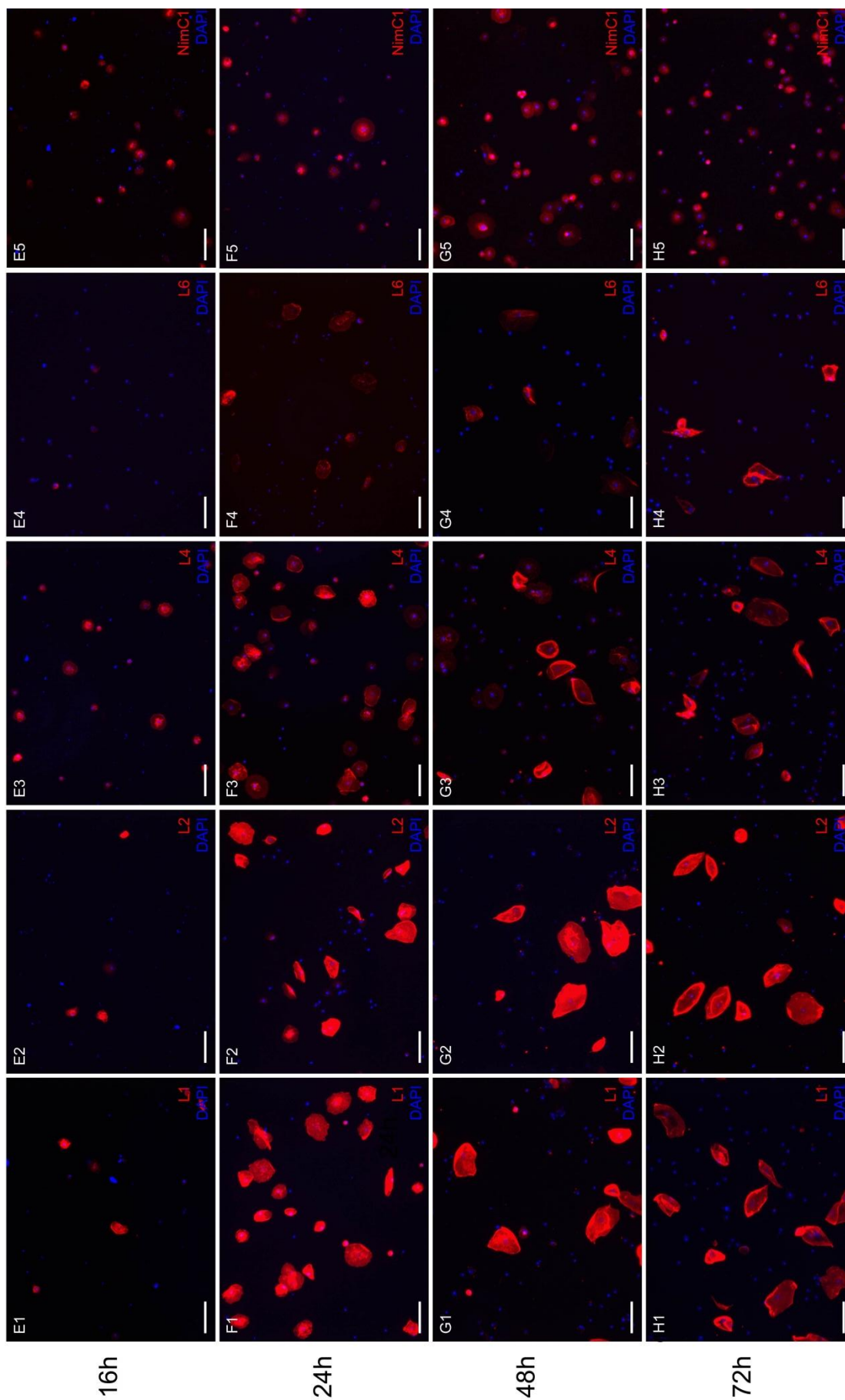


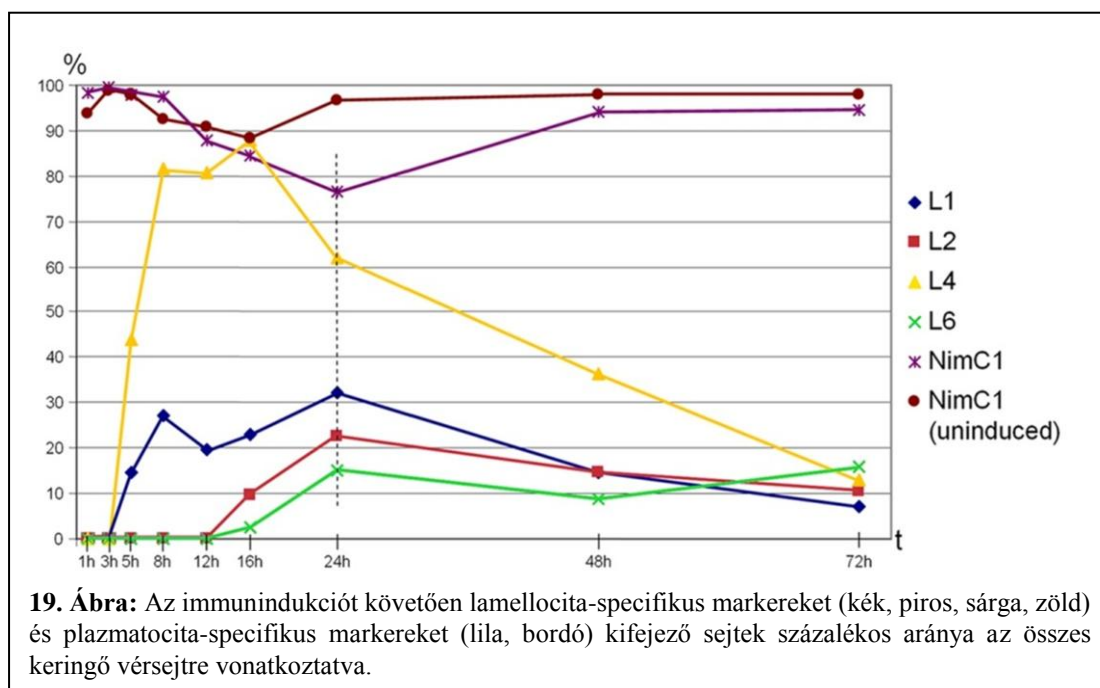


fürkészdarazsakkal fertőztünk, majd az immunindukciótól számított 1., 3., 5., 8., 12., 16., 24., 48. és 72. órát követően jellemeztük a keringő vérsejteket. Az indukciót követő 3. órában a keringő sejtek 95%-a kifejezte a NimC1 markert (**18. Ábra, A5**), azonban lamellocitaspecifikus antigénkifejeződést ebben az időpontban nem tapasztaltunk, eltekintve az L4 marker minden vérsejtre jellemző gyenge expressziójától (**18. Ábra, A3**). Az 5. órában a kis, kerek, plazmatocita morfológiájú sejtek egy része már kifejezte az L1 és L4 markereket (**18. Ábra, B1 és B3**). Nyolc órával a fertőzés után a sejteknek már több mint 80%-a erősen kifejezte az L4 markert (**18. Ábra, C3**). Ugyanebben az időpontban a hemociták 25%-a az L1 markerre nézve volt pozitív (**18. Ábra, C1**). A fertőzést követő első 8 órában morfológiai szempontból a lamellocita markereket kifejező sejteket nem lehetett elkülöníteni a plazmatocitáktól. A vizsgálat 16. órájában a keringő sejtek között megjelentek a plazmatocitáknál kiterültebb sejtek, melyeket diszkoidális vérsejteknek neveztünk el (**17. Ábra; 18. Ábra, E sor**). Ezen sejtek mind az L1, mind az L4 markereket kifejezték (**18. Ábra, E1 és E3**), valamint ezen a sejttypuson figyeltük meg először az L2 marker kifejeződését (**18. Ábra, E2**). Ekkor már találtunk a keringésben olyan terminálisan differenciálódottnak látszó (elongált) lamellocitákat is, amelyek az L6 markert is kifejezték (**18. Ábra, E4**). A 16 és 24 órás vizsgálati pontok között az elongált lamellociták számaránya megnőtt. Ezek a sejtek az L1, L2 és L4 lamellocita markereket kifejezték, illetve ezeknek a sejteknek egy része L6 expressziót is mutatott (**18. Ábra, F sor**). Az immunindukció után 48 órával a diszkoidális morfológiájú sejtek arányának jelentős csökkenését figyeltük meg (**18. Ábra, G sor**). Ezek a sejtek az indukciótól számított 72 óránál teljesen eltűntek a keringésből. Ebben az időpontban az elongált lamellociták (**17. Ábra**) mindegyike kifejezte az L1, L2, L4 és L6 markereket (**18. Ábra, H sor; 19. Ábra**).



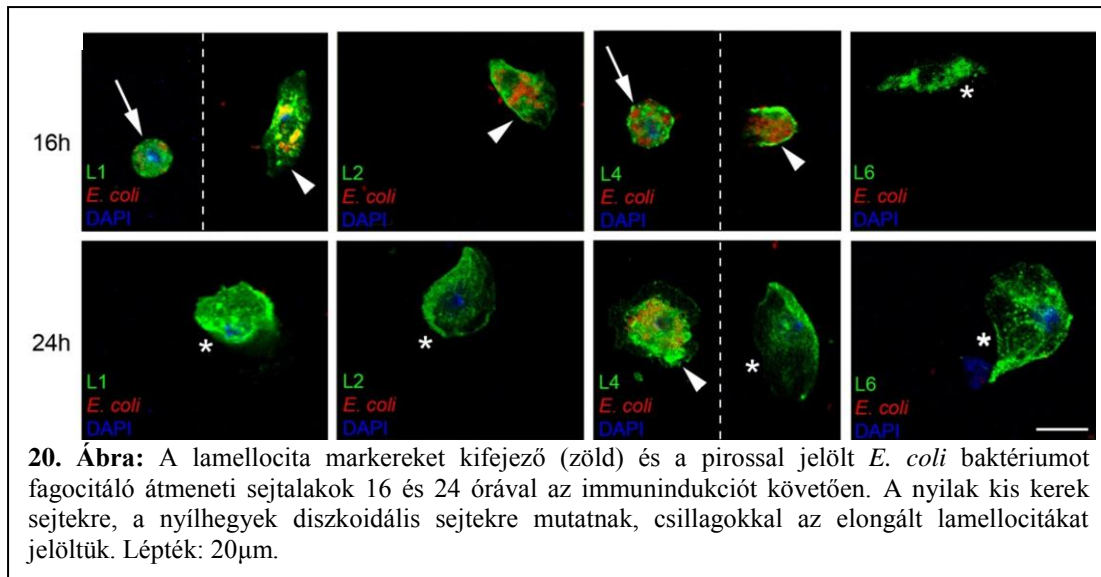
**18. Ábra:** A keringő vérsejtek immunindukciót követően. A vérsejteket lamellocita-specifikus (1-4 oszlop, piros), illetve plazmatocita specifikus markerekkel jelöltük. Lépték: 20µm. Az ábra a következő oldalon folytatódik.





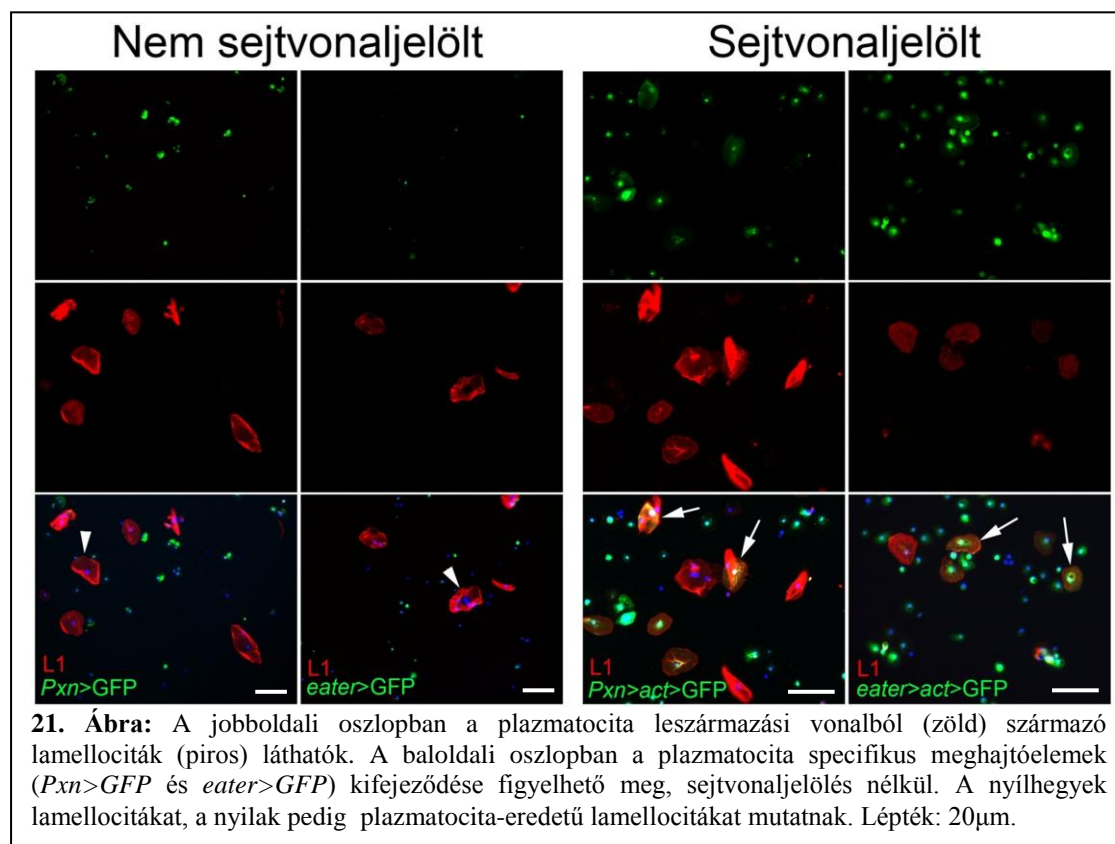
Ezen eredmények alapján azt feltételeztük, hogy a lamellociták egy többlépéses, morfológiai és funkcionális átalakuláson keresztül jutnak el a terminálisan differenciálódott állapotba.

Mivel a korai időpontokban megfigyelt, lamellocita markereket kifejező sejtek morfológiai sajátágaikban plazmatocitákra emlékeztettek, megvizsgáltuk, hogy ezek a korai alakok képesek-e a mikrobák fagocitózisára. Második stádiumú lárvákat immunindukáltunk parazitoid darazsakkal, majd az indukció után megvizsgáltuk a lamellocita markereket kifejező sejtek fagocitáló képességét oly módon, hogy hővel előlt, TRITC konjugált *E. coli* baktérium szuszpenziót injektáltunk a lárvákba. Megállapítottuk, hogy 16 órával az immunindukció után az L1 és L4 markereket kifejező kis kerek sejtek, valamint az L1, L2 és L4 markereket kifejező diszkoidális sejtek is képesek a fagocitózisra. Az indukciót követő 24. órában a keringésben jelen lévő, elongált lamellociták azonban nem kebeleztek be a jelölt mikrobákat (**20. Ábra**).



Ezen eredmények arra utaltak, hogy a plazmatociták egy része - átmeneti alakokon keresztül - lamellocitává differenciálódik. Ahhoz, hogy a leszármazási kapcsolatot közvetlenül igazoljuk, a korábban használt sejtvonajelölő rendszer segítségével irreverzibilisen kijelöltük a plazmatocita leszármazási vonalat. Meghajtóelemnek ebben az esetben a plazmatocitákra jellemző *eater-GAL4* (Tokusumi és mtsai., 2009) és *Pxn-GAL4* (Stramer és mtsai., 2005) forrásokat használtuk. Erről a két meghajtóelemről irodalmi források, valamint saját tapasztalataink alapján tudtuk, hogy a lamellocitákban nem fejeződnek ki. Immunindukciót végeztünk *Pxn>GFP* (*Pxn-GAL4/+*, *UAS-GFP/+*) és *eater>GFP* (*eater-GAL4/+*, *UAS-GFP/+*), valamint *Pxn*-vonajelölt (*FLP/+*, *Pxn-GAL4/AFG*) és *eater*-vonajelölt (*FLP/+*, *eater-GAL4/AFG*) második stádiumú lárvákon. A keringő vérsejteket 72 órával az indukciót követően vizsgáltuk a lamellocitákra specifikus L1 marker immunfluoreszcens jelölésével. A *Pxn>GFP* és *eater>GFP* lárvák keringésében talált lamellociták az eddigi tapasztalatainknak megfelelően nem fejezték ki a plazmatocitákra jellemző GFP-t (**21. Ábra, baloldali oszlop**), azonban a *Pxn* és *eater* sejtvonajelölt lárvákból izolált lamellociták egy része igen; a *Pxn*-

vonalljelölés esetében a lamellociták 46%-a, az *eater*-sejtvonalljelölésnél pedig azok 36%-a bizonyult GFP-pozitívnak (**21. Ábra, jobboldali oszlop**).



Ezen eredmények megerősítették korábbi feltételezéseinket, melyek szerint a lamellociták egy része plazmatocitákból differenciálódik. A differenciálódás során tapasztalható markerexpressziós változások arra utalnak, hogy a plazmatociták lamellocitává történő átalakulásuk során génexpressziós változásokon esnek át. Ezen változások egy része feltehetőleg a fagocita funkció megszűnésével, és a tokképző funkció megjelenésével áll kapcsolatban.

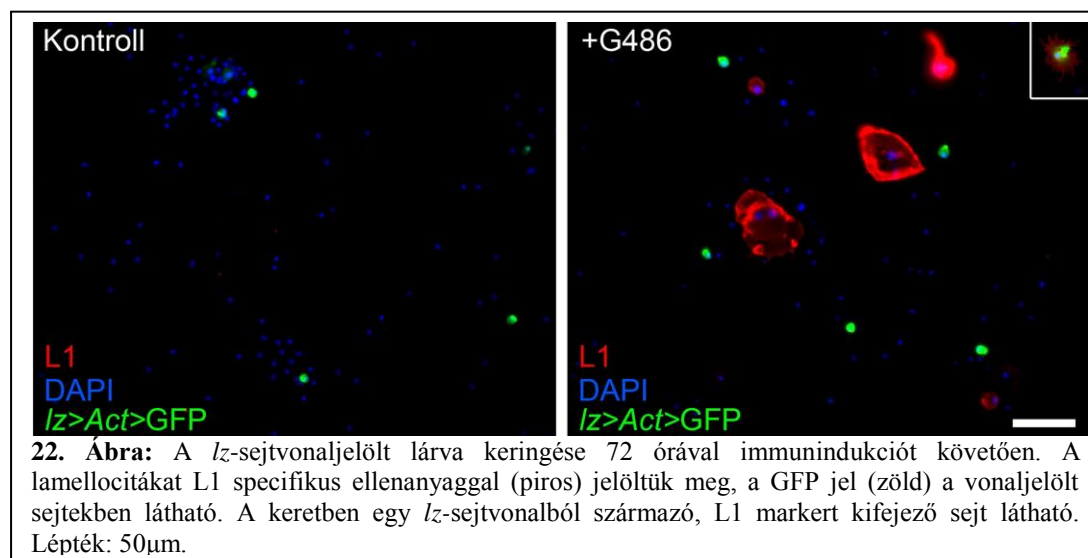
#### 4.2.2 A kristálysejtek plaszticitásának vizsgálata

Az előző fejezetben leírt kísérletek egyértelműen bizonyítják, hogy a plazmatocita leszármazási vonal sejtjei differenciálódási plaszticitást mutatnak. Stofanko és munkatársai megerősítették eredményeinket: a lárvális keringő

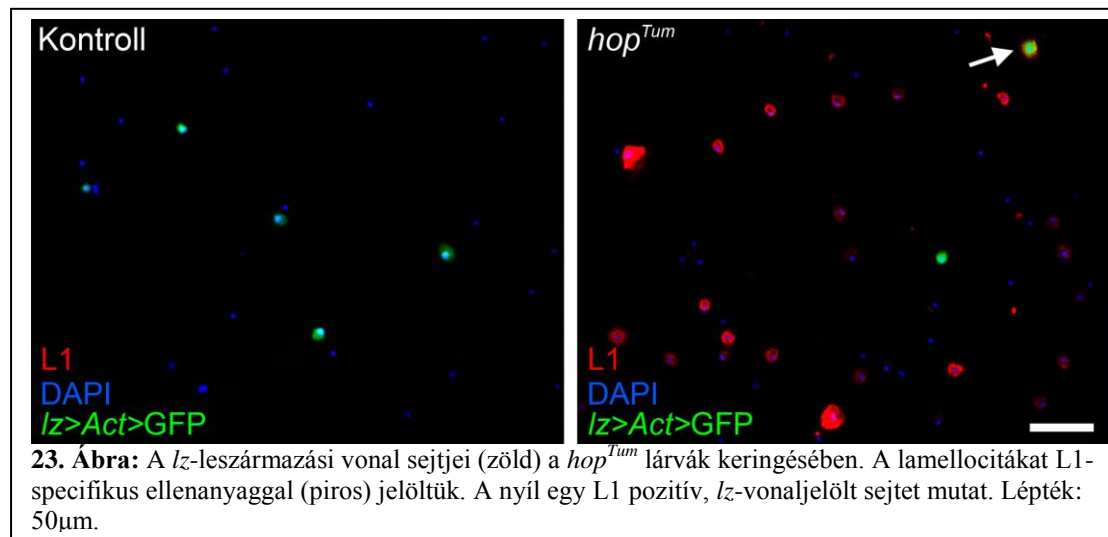


véresejteket *in vitro* körülmények között fenntartva spontán lamellocita differenciálódást tapasztaltak, márpedig jelen ismereteink szerint a keringésben kizárólag differenciálódott plazmatociták és kristálysejtek találhatók. Eredményeik szerint azonban a kristálysejtek nem mutatnak a plazmatocitákra jellemző plaszticitást. A publikációban a kristálysejteket *lz-GAL4* meghajtóelemmel jelölték ki, és ezt a meghajtóelemet használták olyan UAS-transzgének kifejeztetésére, melyek a plazmatocitákban lamellocita irányú transzformációt indukáltak (Stofanko és mtsai., 2010).

Azért, hogy a kristálysejt vonal differenciálódási potenciálját felderítsük, megvizsgáltuk, hogy a teljes *lz*-sejtvonal rendelkezik-e a plazmatocitákéhoz hasonló plaszticitással. A *lz-GAL4* meghajtóelem segítségével sejtvonaljelölést végeztünk, és az előállított *lz-GAL4/FLP*, *AFG/+* genotípusú lárvákat parazitoid darázssal fertőztük. Az immunindukciót követő 72. órában vizsgáltuk a keringő véresejteket, és megállapítottuk, hogy a *lz*-sejtvonalat alkotó sejtek körülbelül egy ezreléke fejezte ki a lamellocitákra jellemző L1 markert (**22. Ábra**). Mivel ezek a sejtek nem mutattak lamellocitákra jellemző morfológiai sajátosságokat (**22. Ábra, keret**), úgy gondoljuk, hogy a *lz*-sejtvonalból immunindukciót követően nem differenciálódnak lamellociták.



Mivel a tumoros mutánsokban szinte minden esetben megfigyelhető spontán lamellocita differenciálódás (Rizki, 1979; Konrad és mtsai., 1994; Luo és mtsai., 1995), megvizsgáltuk, hogy a tumorok indukálta lamellociták között találhatók-e olyanok, amelyek a *lz*-sejtvonalból származnak. Ehhez keresztezéssel *UAS-FLP*, *lz-GAL4/hop<sup>Tum</sup>*; *AFG/+* genotípusú lárvákat hoztunk létre, melyekből vérsejteket izoláltunk. A vérsejteket az L1 lamellocita-specifikus markerrel jellemeztük.



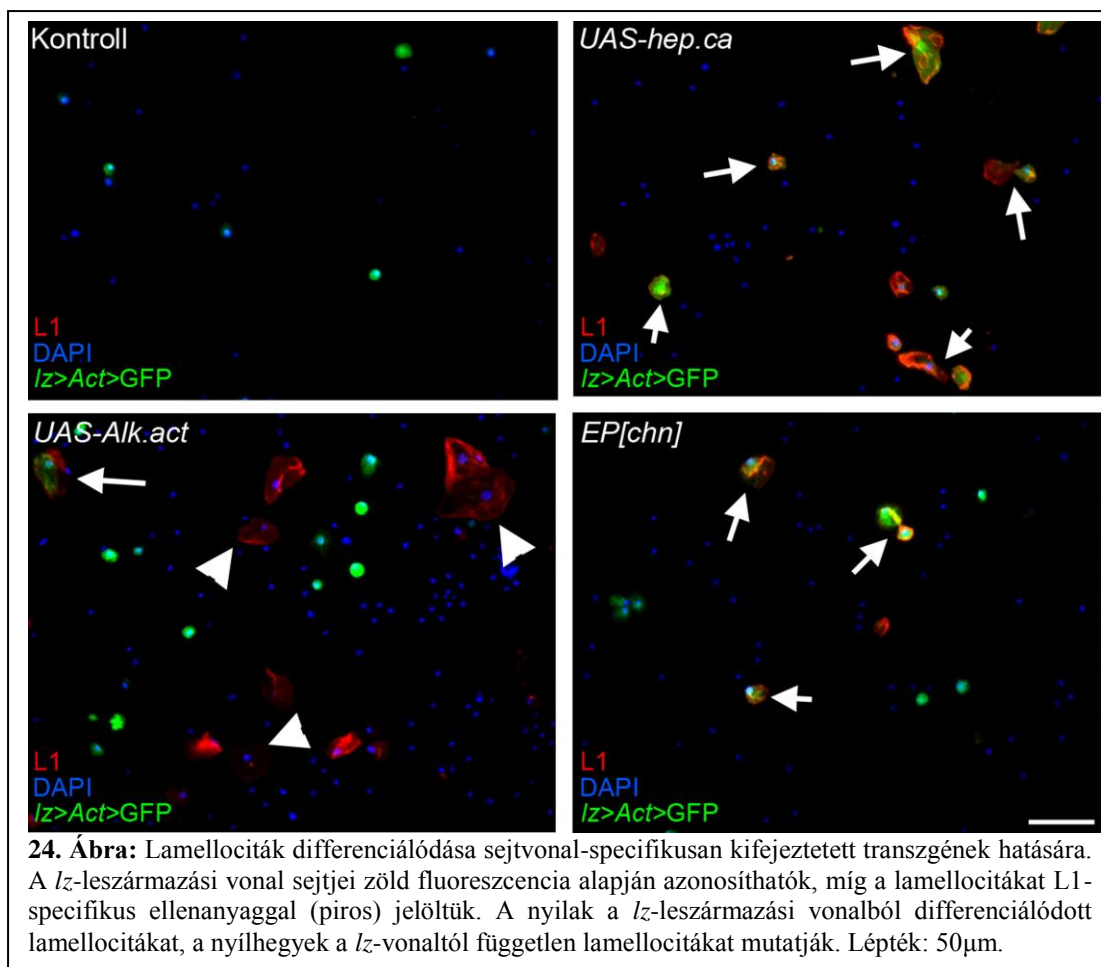
A mintákban megemelkedett vérsejtszámot, valamint lamellocitákat figyeltünk meg, azonban a *lz*-sejtvonaljelölt sejtek száma nem változott a kontroll lárvákéhoz képest. Az immunindukció esetében tapasztaltakhoz hasonlóan az L1 markert kifejező sejtek kevesebb, mint egy ezreléke származott a *lz*-sejtvonalból (**23. Ábra**). Ezek alapján megállapítottuk, hogy a *lz*-sejtvonal sem immunindukció hatására, sem a *hop<sup>Tum</sup>* vérsejttumoros háttéren (a JAK/STAT útvonal konstitutív aktiválásának hatására) nem képes lamellocita irányú differenciálódásra.

Mivel sem parazitoid darázs által kiváltott immunindukció, sem a *hop<sup>Tum</sup>* mutáció nem indukált lamellocita differenciálódást a *lz*-sejtvonalból, megvizsgáltuk, hogy ezen sejtvonal sejtjei teljes mértékben elköteleződtek-e a kristálysejt irányba, vagy a lamellocita irányú transzformációjuk specifikusan kifejeztetett transzgenek hatására indukálható.



Kísérleteinkben három olyan transzgént vizsgáltunk meg - az *UAS-Alk.act*, az *UAS-hep.ca* és az *EP[chn]* elemeket - melyeknek a vérsejtdifferenciálódásra gyakorolt hatását már korábban leírták (Zettervall és mtsai., 2004; Stofanko és mtsai., 2010; részletesen ismertetve az **1.2.5.3** fejezetben).

Keresztezéssel olyan lárvákat hoztunk létre, amelyek a sejtvonaljelölő rendszeren kívül tartalmazták a vizsgálni kívánt transzgéneket is. Ezen lárvákból vérsejteket izoláltunk, és az L1 lamellocita markerre specifikus ellenanyaggal indirekt immunfluoreszcens festést végeztünk. Az *UAS-FLP*, *l<sub>z</sub>-GAL4/+*; *AFG/UAS-Alk.act* lárvák keringésében a kontrollhoz (*UAS-FLP*, *l<sub>z</sub>-GAL4/+*; *AFG/+*) képest a *l<sub>z</sub>*-sejtvonalat alkotó sejtek számának növekedését figyeltük meg, ami az *Alk* vérsejtproliferatív hatásával magyarázható. A keringő sejtek között megfigyeltünk L1 markert kifejező lamellocitákat is, melyek egy része a *l<sub>z</sub>*-sejtvonaljelölésre specifikus GFP jelet is hordozott (**24. Ábra**). Az *l<sub>z</sub>*-sejtvonaljelölt sejtek számának növekedését, valamint lamellociták differenciálódását az *UAS-FLP*, *l<sub>z</sub>-GAL4/+*; *AFG/UAS-hep.ca* genotípusú lárvákban is megfigyeltük. Jelentős különbséget találtunk azonban a lamellociták eredetében: ezen lárvákban a lamellociták túlnyomó többsége (81%-a) a *l<sub>z</sub>*-sejtvonalból származott (**24. Ábra**). Az *UAS-FLP*, *l<sub>z</sub>-GAL4/+*; *AFG/EP[chn]* harmadik stádiumú lárvák esetében a *l<sub>z</sub>*-sejtvonaljelölt vérsejtpopuláció számbeli változást nem mutatott a kontrollhoz képest, viszont ebben a genotípusban is lamellociták képződését figyeltük meg. Az előzőleg bemutatott transzgénekkal szemben azonban a lamellocita differenciálódás teljes mértékben a *l<sub>z</sub>*-sejtvonalra korlátozódott (**24. Ábra**).



Eredményeink fényében megállapítottuk, hogy a korábban leírt, lamellocita-differenciálódást indukáló transzének (Zettervall és mtsai., 2004; Stofanko és mtsai., 2010) a *lz*-leszármazási vonalban is elősegítik a tokképző sejtek képződését. Az Alk aktivált formájának kifejeztetése esetén ezen felül olyan lamellocitákat is megfigyeltünk, melyek nem a *lz*-sejtvonalból származtak. Ez az eredmény a vérsejtképzés szabályozásának egy nem sejt-autonóm szintjére utal; az Alk-ot kifejező sejtek egyéb sejtvonalak differenciálódási folyamataira is hatással vannak.

#### 4.3 A vérsejtlezármazási vonalak sorsa a bábban és a kifejlett egyedben

A bábozódással járó szöveti átrendeződés a vérsejtképző kompartmentumokat is érinti. A központi nyirokszerv kortikális zónája megduzzad, medulláris zónája pedig eltűnik, ami arra utal, hogy az ott található progenitor sejtek effektor irányba

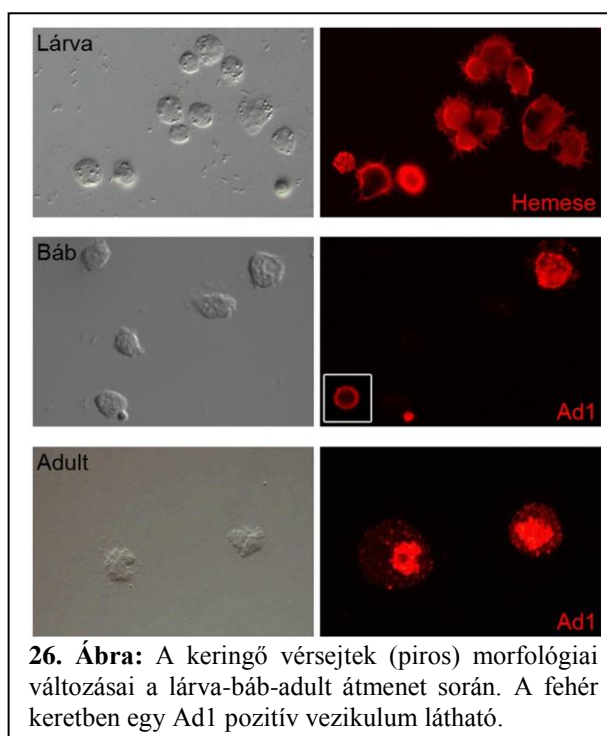
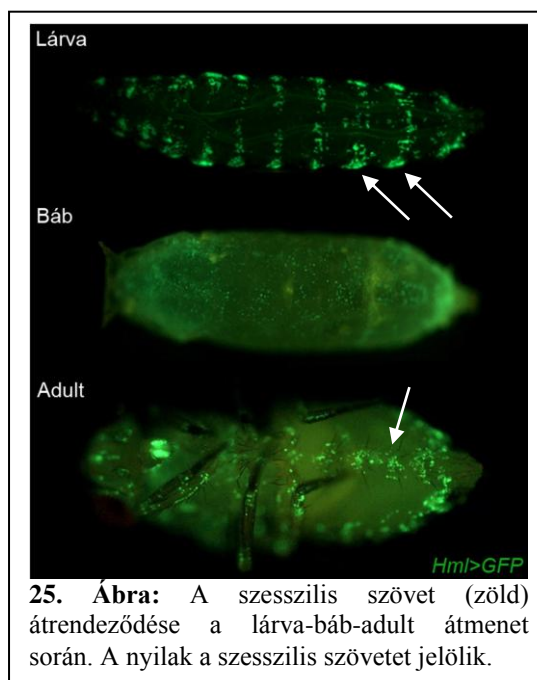
differentiálódnak. A sejtek ezt követően elhagyják a központi nyirokszervet, maguk után hagyva az üres bazális membránt (Grigorian és mtsai., 2011).

Mivel a lárvális vérsejtkompartmentumok közül ezt a szervet jellemezték egyedül a báb-állapot során, kíváncsiak voltunk, hogy a keringés és a szesszilis szövet milyen átrendeződésen megy keresztül ebben a

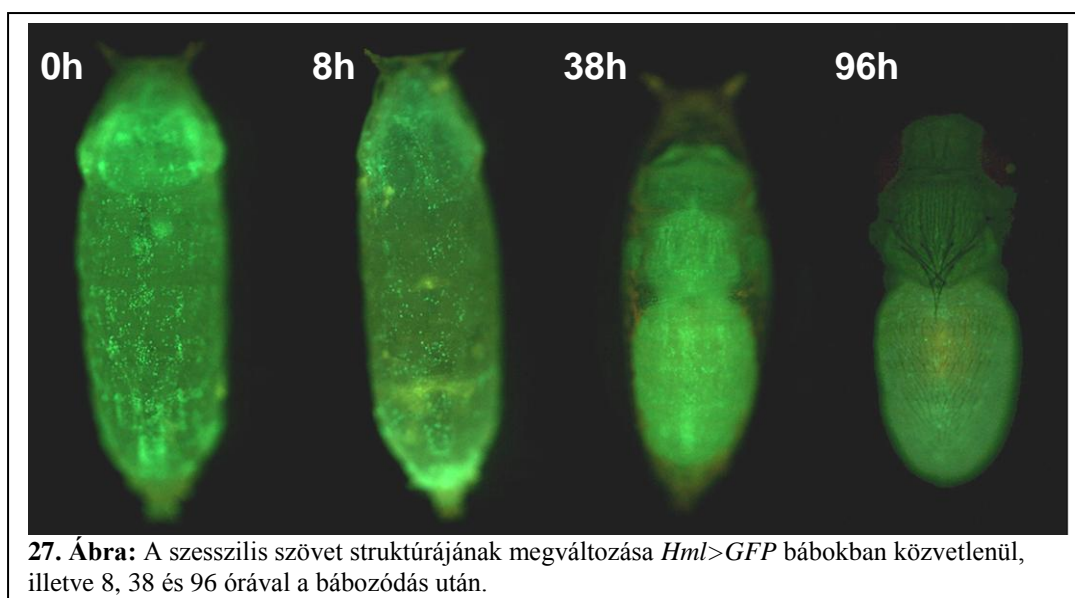
fejlődési szakaszban, és hogy milyen szerepet játszik a kifejlett állat immunrendszerének kialakításában (25. Ábra).

A báb vérsejtjeinek alaktani jellemzése során megfigyeltük, hogy a hemociták nem a lárvára jellemző kerek morfológiát mutatják, hanem a kitapadt sejtek körvonala

egyenetlen, és alakjuk kissé megnyúlt (26. Ábra, Lárva és Báb). Jellemző továbbá, hogy membránnal határolt vezikulumokat tartalmaznak (26. Ábra, keret). Ilyen vezikulumok a hemolimfában szabadon is megtalálhatók, és vérsejtekre specifikus markereket - H3-at, NimC1-et, valamint az adult vérsejtekre jellemző Ad1-et - hordoznak.



A lárvális életszakasz végén - ha elhanyagolható számban is - spontán lamellocita differenciálódás következik be (Rizki, 1957). Mivel kíváncsiak voltunk az így létrejövő tokképző sejtek sorsára, a már bemutatott sejtvonalljelölő rendszert lamellocita-specifikus GAL4 forrással (*msn-GAL4*) kombinálva kijelöltük ezt a leszármazási vonalat. Megfigyeltük, hogy a bábban ritkán előforduló lamellociták a bábozódást követő 24. órában már nem találhatók meg. Ebből arra következtettünk, hogy a tokképző sejtek valószínűleg nem vesznek részt a báb fejlődése során lejátszódó szöveti átrendeződésben.

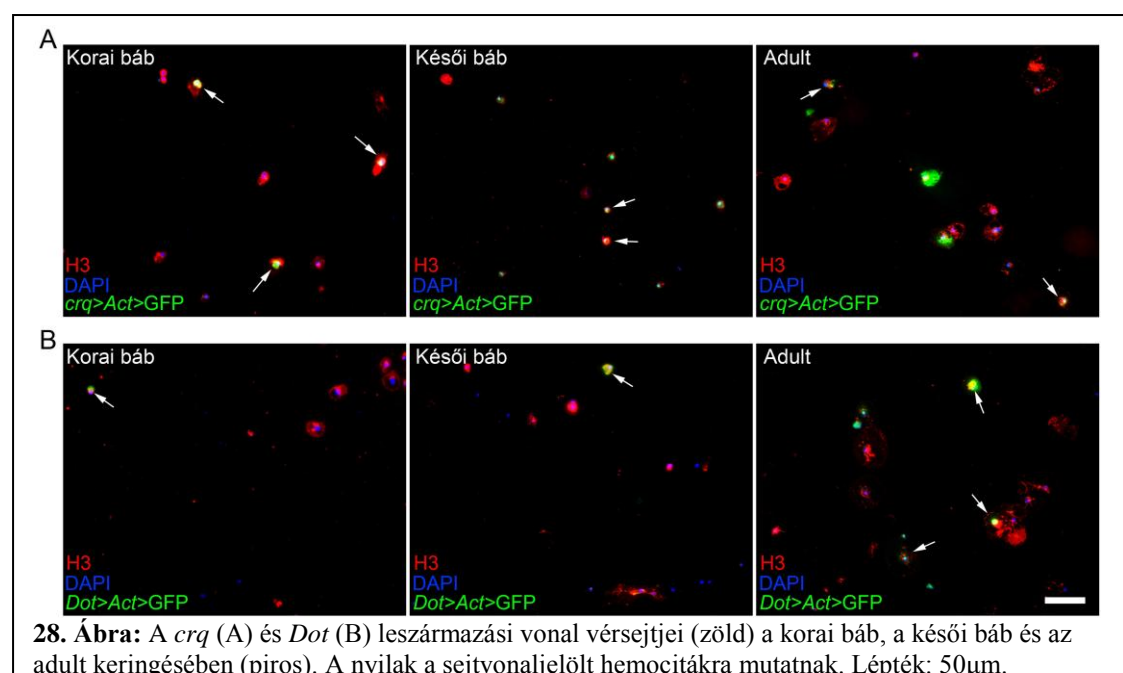


Hogy felderítsük a szesszilis szövet báb stádiumban bekövetkező változásait, *Hml>GFP* genotípusú friss fehér bábokat szinkronizáltunk: a bábképződést követően azonnal legyűjtöttük a bábokat, majd epifluoreszcens sztereomikroszkóp segítségével két óránként felvételeket készítettünk róluk. Megfigyeltük, hogy a báb-állapot első 8 órájában a szesszilis szövetnek a lárvára jellemző sávozott mintázata felbomlik (**27. Ábra, 0h és 8h**), a GFP-t kifejező vérsejtek pedig szabadon keringenek a báb hemolimfájában.

Ebben a fejlődési stádiumban a bábozódástól számított 38. óráig csak elszórt vérsejteket figyelhetünk meg, azonban azt tapasztaltuk, hogy a későbbiekben a

véresejtek a szívcső köré csoportosulnak (27. Ábra, 38h). Ez a mintázat a báb fejlődésének előrehaladtával fokozatosan eltűnt, a 96 órás báb pedig már a felnőtt állatokra jellemző véresejtlokalizációt mutatott: a véresejtek a potroh háti oldalán elszórva helyezkedtek el, a hasi oldalon pedig egyetlen hosszanti sávot alkottak (27. Ábra, 96h).

Miután a lárva-báb-adult átmenet során anatómiai szempontból jellemeztük a véresejtképző kompartmentumok fejlődését, a leszármazási vonalak követésével is megvizsgáltuk az egyes lárvális kompartmentumokból származó véresejtek sorsát. Ehhez a 4.1 fejezetben ismertetett módon a központi nyirokszervet a *Dot* meghajtóelemmel, míg a keringést és szesszilis szövetet a *crq* meghajtóelemmel jelöltük ki. A báb véresejtjeit különböző időpontokban izoláltuk, és egy pánhemocita marker (H3) segítségével vizsgáltuk. Megfigyeléseinket korai (<1 napos) illetve késői (3 napos) bábban, valamint kifejlett adultokon végeztük. Azt tapasztaltuk, hogy a *Dot*- és *crq*-sejtvonalak sejtjei mind a különböző stádiumú bábok, mind az adult keringésében jelen vannak (28. Ábra), ami arra utal, hogy az adult véresejtjeinek differenciálódásában mindhárom lárvális véresejtkompartimentum részt vesz.

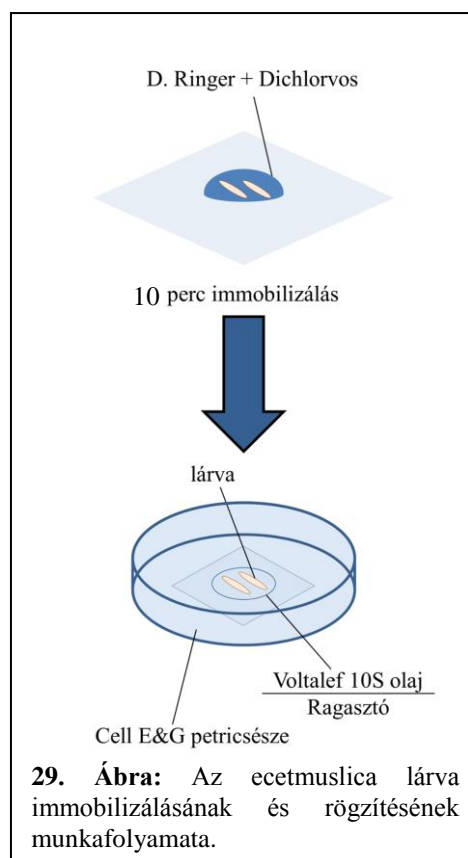


#### **4.4 A szesszilis szövet vizsgálata élő lárvákban: *in vivo* immunfluoreszcian alapuló módszer fejlesztése**

Mind az irodalmi adatokból (Stofanko és mtsai., 2008; Márkus és mtsai., 2009; Honti és mtsai., 2010, Makhijani és mtsai., 2011), mind a dolgozatban eddig bemutatott eredményekből egyértelműen kiderül, hogy a szesszilis vérsejtképző szövet fontos szerepet játszik az immunválaszban. A szövet további jellemzését azonban rendkívül megnehezíti annak fizikai behatásokra való érzékenysége. Ezért szerettünk volna kifejleszteni egy módszert, amely lehetőséget biztosít a szesszilis szövet *in situ* vizsgálatára, valamint annak részletes, vérsejt típusokra specifikus markerekkel történő immunológiai jellemzésére.

Elsőként a lárvák stabil - és visszafordítható- immobilizálását kellett megoldanunk. Erre ugyan a szakirodalom számos lehetőséget vet fel (pl. szén-dioxid, hűtés, mikrofluidikai chip-ben történő fizikai rögzítés), azonban ezek kivitelezése technikailag nehézkes.

Kísérleteinkben a Dichlorvos bénító hatását használtuk ki. A Dichlorvos (2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate) egy széleskörben elterjedt rovarirtó szer, mely az acetilkolin-észteráz enzimet gátolva bénítja meg az állatokat. Előkísérleteink alapján



megállapítottuk, hogy a Dichlorvost *Drosophila* Ringer oldatban 1:1000 hígításban alkalmazva 10 perces kezelést követően az állatok reverzibilisen, hozzávetőlegesen 45 percre megbénulnak.

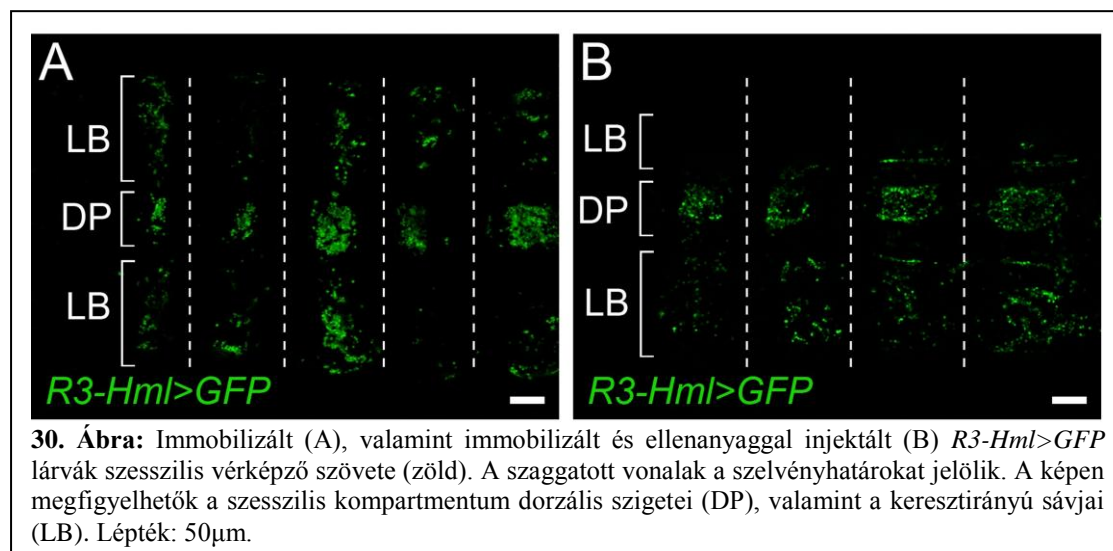
Vizsgálatainkhoz *Hml>GFP<sup>TURBO</sup>* genotípusú lárvákat immobilizáltunk Dichlorvos oldatban, majd a mozdulatlan lárvákat ragasztóval előkezelt üveglemezaljú műanyag Petri-csészékre ragasztottuk. A kiszáradást elkerülendő a lárvákra Voltalef 10S olajat rétegeztünk (**29. Ábra**). Az így előállított mintákat konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Az előkészített lárvákról nagy felbontású, 15 mélységi rétegből álló Z-projekciókat készítettünk. Ezt követően öt mélységi szeletből álló videófelveteleket készítettünk az immobilizált lárvák vérsejtjeiről. A felvételek kiértékelésekor megfigyeltük, hogy a lárvák az immobilizálás ellenére kismértékben mozogtak, a szívcső pulzált, amelyek bizonyították, hogy a lárvák a vizsgálat során életben voltak. A mozgás mértéke a felvételek kiértékelhetőségét nem befolyásolta. A felvételek rávilágítottak arra, hogy a keringés és a szesszilis szövet között folyamatos sejtmozgás történik; a két vérsejtképző kompartmentum nem izolálható egymástól.

Ezután a szesszilis kompartmentumot alkotó vérsejtpopulációkat vizsgáltuk meg a transzgenikus riporter-konstrukciók, valamint a laboratóriumunkban azonosított immunológiai markerek segítségével. Mivel az eddig használt kísérleti módszert (a lárvák felboncolását és fixálását) a szesszilis szövetben okozott roncsolás miatt elvetettük, felvázoltunk egy új kísérleti munkafolyamatot, mely a következő lépésekből áll:

- 1.) Vérsejtspecifikus antitestből és az arra specifikus, fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyagból keveréket hozunk létre.
- 2.) Az ellenanyag keveréket a lárva testüregébe injektáljuk.

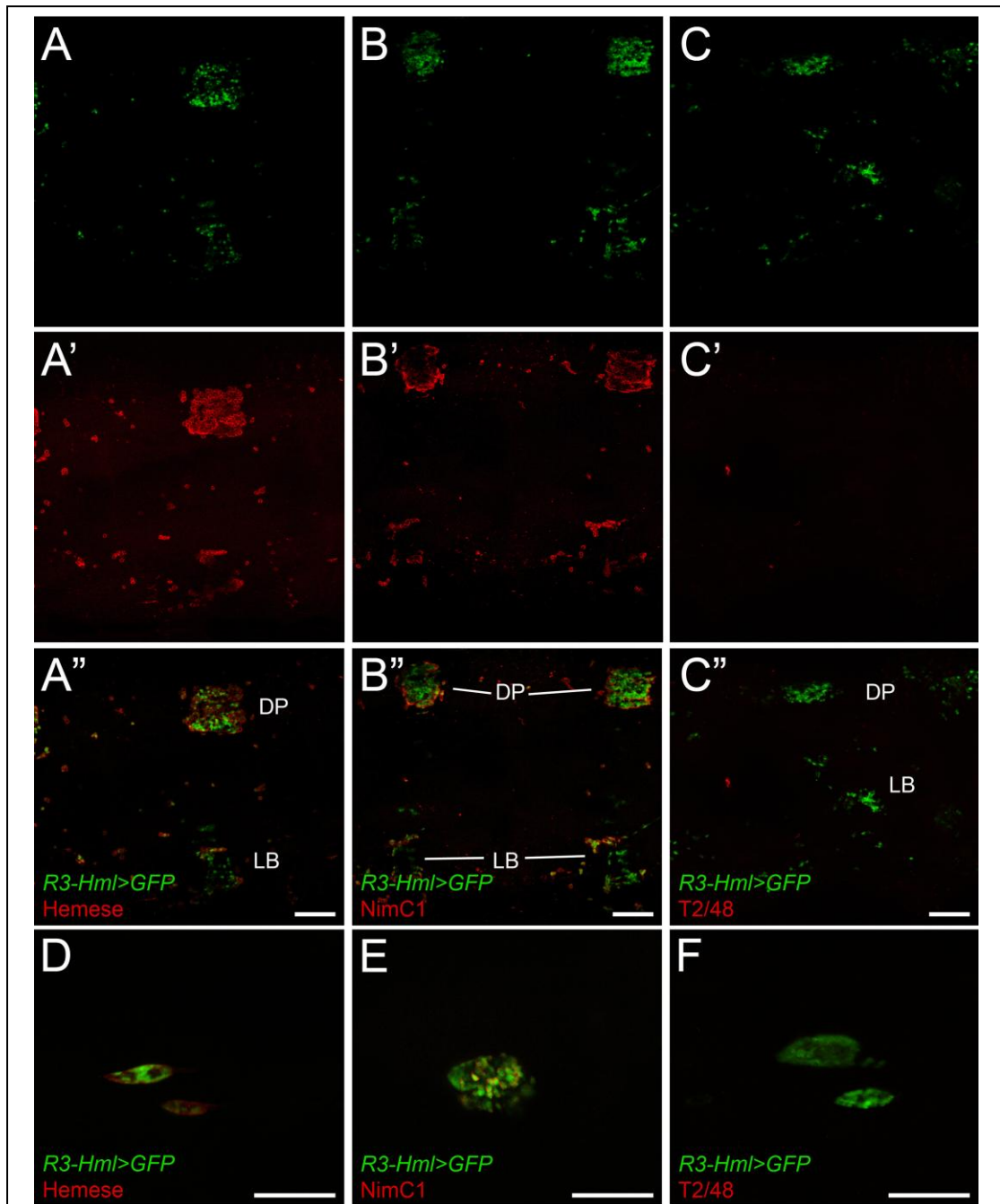
- 3.) Az injektált lárvákat Dichlorvos oldatban immobilizáljuk.
- 4.) Az immobilizált lárvákat üvegaljú Petri-csészére ragasztjuk, majd Voltalef olajjal lefedjük.
- 5.) Az elkészített mintákról konfokális felvételeket készítünk.

Előkísérleteket végeztünk annak megállapítására, hogy az injektálás károsítja-e a szesszilis szövet szerkezetét. Nem injektált, valamint KRPMI médiummal injektált *Hml>GFP* genotípusú lárvákat immobilizáltunk és vizsgáltunk konfokális mikroszkópiával (**30. Ábra**). A lárvák szesszilis szövetét mindkét esetben épnek találtuk. Mind a háti, mind az oldalsó szesszilis sejtcsoportok megtartották szerkezetüket, azonban az injektált lárvákban a szesszilis szigetek közötti távolság megnőtt a kontrollokhoz képest: a jelenséget az injektálás miatt bekövetkező térfogati növekedésnek tulajdonítottuk.



Harmadik stádiumú *R3-Hml>GFP* lárvák szesszilis vérsejtkompartimentumait pán-hemocita 1.2 (anti-Hemese) és plazmatocita specifikus N1+N47 (anti-NimC1) elsődleges ellenanyagokkal, valamint izotípus-párosított negatív kontrollal (T2/48: anti-humán CD45 ellenanyag) jellemeztük, másodlagos ellenanyagként pedig anti-





**31. Ábra:** *R3-Hml>GFP* lárvák szesszilis vérsejtképző kompartmentuma (DP: dorzális sziget, LB: keresztirányú sáv; A-C, zöld), valamint központi nyirokszerve (D-F, zöld) *in vivo* jelölve Hemese (A' és D), NimC1 (B' és E), valamint negatív kontroll humán-CD45 (C' és F) markerek elleni ellenanyag-keverékekkel (piros). Lépték: 50µm.

egér-Alexa-633 távoli vörös fluoreszkáló ellenanyag konjugátumot használtunk, ezzel minimalizálva a fluoreszcens csatornák közötti áthallást. Az ellenanyag keverékekkel injektált lárvákat konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Mind a pánhemocita-, mind a plazmatocita specifikus marker esetében azt tapasztaltuk, hogy a GFP jelölt szesszilis vérsejtek több mint 80 százaléka specifikus membránfestődést

mutat, míg a T2/48 negatív kontroll ellenanyagot tartalmazó keverék nem reagált a lárvális szövetekkel (**31. Ábra, A, B és C**).

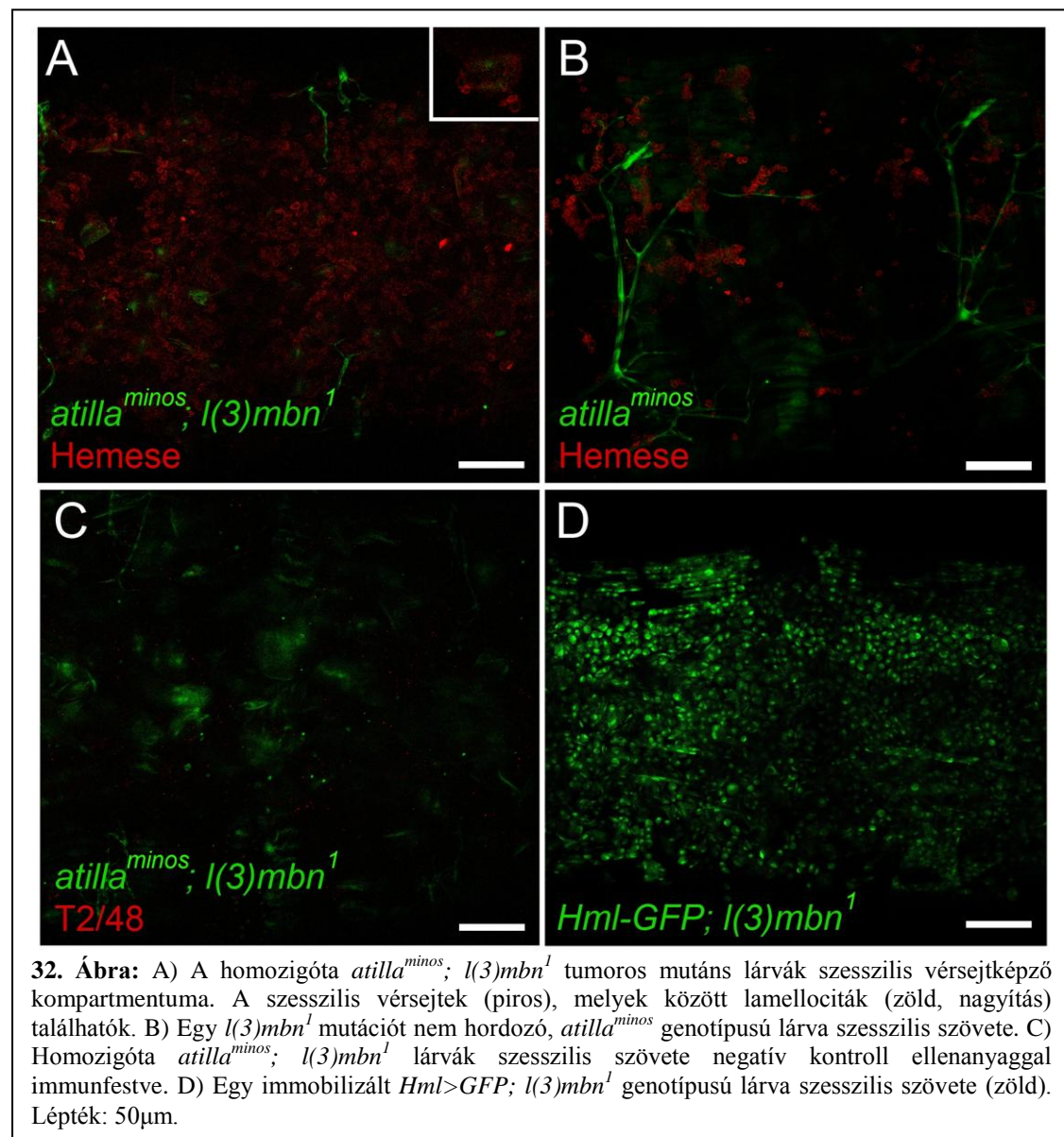
Az injektált lárvák központi nyirokszervét megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a Hemese elleni ellenanyag-keverék a teljes elsődleges lebenyt kijelöli, míg a NimC1 elleni keverék foltos jelölődést mutat az elsődleges lebenyben. A negatív kontroll ellenanyag-keverék nem reagált a központi nyirokszervvel (**31. Ábra, D, E és F**).

Mivel tumoros mutáns lárvák szesszilis vérsejt kompartmentumáról rendkívül kevés információ áll rendelkezésünkre, kísérleti rendszerünkkel megvizsgáltuk az *l(3)mbn<sup>1</sup>* homozigóta lárvák ezen szövetét (a mutáció fenotípusa az **1.2.5.3** fejezetben került ismertetésre).

Korábban laboratóriumunkban előállítottunk olyan *l(3)mbn<sup>1</sup>* mutációt hordozó *Drosophila* törzseket, melyek vérsejtspecifikus *in vivo* riportereket is tartalmaztak; a *Hml>GFP; l(3)mbn<sup>1</sup>/TM6B* törzs plazmatocitákban kifejeződő riportert tartalmaz, míg az *atilla<sup>minos</sup>; l(3)mbn<sup>1</sup>/TM6B* törzsben lamellocita-specifikus GFP forrás található (Honti és mtsai., 2009).

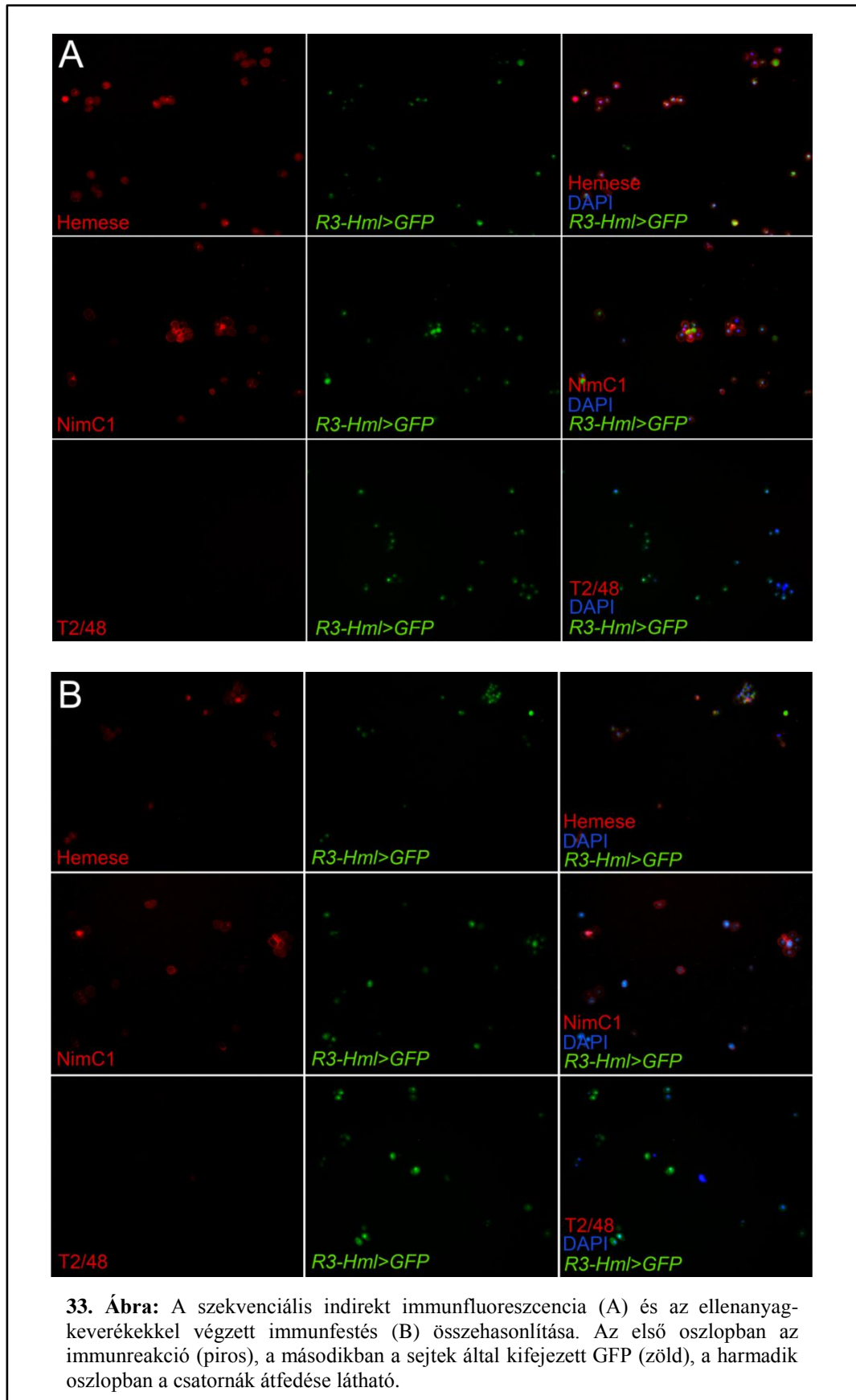
Harmadik stádiumú homozigóta *atilla<sup>minos</sup>; l(3)mbn<sup>1</sup>* lárvákat 1.2:anti-egér-Alx-633 valamint T2/48:anti-egér-Alx-633 keverékkel injektáltuk, majd immobilizálást és rögzítést követően konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A Hemese elleni immunfestés esetében azt tapasztaltuk, hogy a szesszilis vérsejtek száma jelentősen megemelkedett a korábban vizsgált, vad típusú lárvákéhoz képest, míg a negatív kontroll ellenanyaggal (T2/48) nem kaptunk jelet (**32. Ábra, A, C**). A zöld fluoreszcens csatornában lamellocita-specifikus GFP jelet detektáltunk a szesszilis szövet számos sejtjében, amelyeket morfológiájuk alapján is lamellocitáknak azonosítottunk. A kísérlet kontrolljaként az *l(3)mbn<sup>1</sup>* mutációt nem hordozó, *atilla<sup>minos</sup>* lárvákat is injektáltunk Hemese:anti-egér-Alx-633 keverékkel, amely esetben nem

találtunk lamellocitákat, és a vad típusra jellemző szesszilis szövet-mintázatot figyeltük meg (32. Ábra, B).



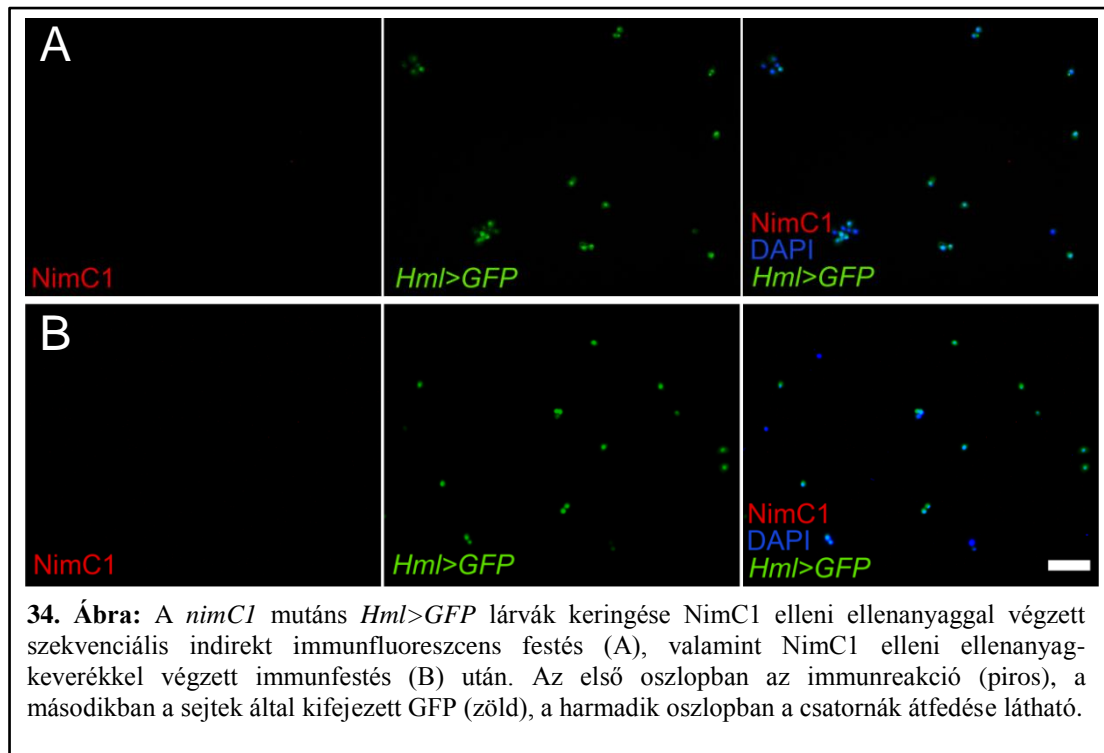
Annak érdekében, hogy az immunfestéssel tapasztalt jelenséget egy plazmatocita-specifikus *in vivo* riporterrel is megerősítsük, megvizsgáltuk a harmadik stádiumos homozigóta *Hml>GFP; l(3)mbn<sup>1</sup>* lárvák szesszilis szövetét is (32. Ábra, D). A konfokális felvételeken a korábban bemutatott *R3-Hml>GFP* lárvákéhoz képest jelentősen kiterjedtebb szesszilis szövetet figyeltünk meg, amely megerősítette azt a korábbi feltételezésünket, mely szerint nem csak a keringés és a központi nyirokszerv,

hanem a testfalhoz lokalizálódó hematopoietikus kompartmentum véresejtszáma is drasztikus mértékben megnövekszik az *l(3)mbn<sup>1</sup>* mutáns lárvákban.



Mivel előfordulhat, hogy az ellenanyagokból képződő immunkomplexek specifikitása különbözik attól, ami egy szekvenciális indirekt immunfluoreszcens festés során tapasztalható, véresejtpreparátumokat készítettünk harmadik stádiumú *R3-Hml>GFP* lárvákból, melyeken összehasonlítottuk a szekvenciális indirekt immunfluoreszcenciával, valamint az előállított ellenanyag-keverékekkel kapott reakciókat. A kísérletekhez a korábban alkalmazott elsődleges és másodlagos ellenanyagokat használtuk. A minták kiértékelésekor megállapítottuk, bár az indirekt immunfluoreszcencia esetében kissé erősebb reakciót tapasztaltunk, a reakció specifikitása a két kísérleti módszerben megegyezik, (**33. Ábra**).

További ellenőrzésként a *nimC1* génre nézve mutáns *Hml>GFP* lárvákból is véresejteket izoláltunk, majd a mintákat NimC1 elleni ellenanyaggal, illetve ellenanyag-keverékkel immunfluoreszcens festést hajtottunk végre. Egyik kísérleti elrendezésben sem tapasztaltunk reakciót (**34. Ábra**).



A bemutatott kontroll kísérletek eredményeiből arra következtettünk, hogy a szesszilis szövet *in situ* vizsgálatához alkalmazott keverékek specifitásukban nem mutatnak különbséget a korábban alkalmazott indirekt immunfluoreszcens festéshez képest.

## 5. Az eredmények megvitatása

### 5.1 A lárvális vérsejtek eredete és plaszticitása

Az *ecetmuslica* vérsejtjeit és vérsejtképzését az 1950-es évek óta vizsgálják. A korai munkák a vérsejtek fenotipikus és funkcionális jellemzésére törekedtek (Rizki, 1957, Rizki és Rizki, 1989), majd a hangsúly a hemocitáknak az immunválaszban betöltött szerepére tevődött át (Rizki és Rizki, 1990; Carton és Nappi, 1997). A vérsejtekben kifejeződő fehérjék vizsgálatával olyan molekulákat azonosítottak, melyek az immunfunkciók ellátáshoz szükségesek (Franc és mtsai., 1996; Kurucz és mtsai., 2003; Kurucz és mtsai., 2007a). A molekuláris markerek és *in vivo* riporterek létrehozásával lehetővé vált a vérsejtkompartimentumok megismerése (Lanot és mtsai., 2001; Zettervall és mtsai., 2004), valamint bepillantást nyerhettünk a hemociták differenciálódását szabályozó mechanizmusokba is (Lebestky és mtsai., 2000; Lebestky és mtsai., 2003, Sorrentino és mtsai., 2004; Jung és mtsai., 2005; Krzemien és mtsai., 2007; Mandal és mtsai., 2007).

A laboratóriumunkban korábban elvégzett kísérletek során molekuláris markerek segítségével jellemeztük az *ecetmuslica* lárva vérsejtjeit, illetve vérsejtképző szöveteit (Kurucz és mtsai., 2003; Kurucz és mtsai., 2007a; Kurucz és mtsai., 2007b; Márkus és mtsai., 2009). A markerek segítségével pontosan megismerhettük a *Drosophilában* található vérsejttípusokat, azonban - mivel ezek az eredmények mindig a vérsejtek pillanatnyi állapotát mutatták be - nem adtak lehetőséget a vérsejtek leszármazási viszonyainak egyértelmű tisztázására.

A dolgozatban bemutatott munkánk során fő célunk az volt, hogy azonosítsuk és az állat teljes egyedfejlődésén át kövessük az *ecetmuslica* vérsejt leszármazási

vonalaikat. Arra voltunk kíváncsiak, hogy mely vérsejtvonalak játszanak szerepet az egyes vérsejtkompartimentumok létrehozásában, illetve az egyes vérsejttípusok differenciálódásában.

A probléma kísérleti megközelítéséhez egy GAL4/UAS rendszerre épülő transzgenikus sejtvonaljelölő rendszert alkalmaztunk. A rendszerhez olyan meghajtóelemeket kellett kiválasszunk, amelyek az általunk kívánt leszármazási vonalakat átfedés nélkül reprezentálják, ezáltal azok egymástól független vizsgálatát teszik lehetővé. A meghajtóelemekre jellemző, hogy a sejtekben bekövetkező génexpressziós változások hatására inaktiválódhatnak, amiről egyaránt rendelkezésünkre álltak irodalmi adatok (Buenzow és Holmgren, 1995; Evans és mtsai., 2009), valamint saját kísérletes tapasztalatok. Az általunk választott rendszerben ezzel szemben a jel a Flip enzim mediálta rekombinációs eseményt követően rögzül (konstitutív GAL4 forrás aktiválódik), így a sejtek - és utódsejtjeik - irreverzibilisen megjelölődnek.

A Bevezetés 1.2.5.2 fejezetében ismertetett G-TRACE rendszer hasonló elven működik, azonban a Flip-rekombinációt követően ebben az esetben közvetlenül a riportergén (*GFP*) aktiválódik, emiatt a riporter kifejeződés erőssége elmarad az általunk alkalmazott rendszerétől. További fontos - az előzőleg említett különbségből fakadó - hiányossága a G-TRACE rendszernek, hogy nem bővíthető további, UAS-vezérelte transzgénekkel (Evans és mtsai., 2009).

Érdemes megemlíteni, hogy az általunk használthoz hasonló, vagy azzal teljesen megegyező *in vivo* sejtvonaljelölő rendszert több munkacsoport is alkalmazott a vérsejt leszármazási vonalak követésére ecetmuslicában (Avet-Rochex és mtsai., 2010; Stofanko és mtsai., 2010).



Két, egymástól független eredetű embrionális vérsejteszármazási vonalat követtünk a lárvális fejlődés során. Megállapítottuk, hogy az embrionális makrofág leszármazási vonal sejtjeiből a lárvális keringést és szesszilis szövetet alkotó hemociták képződnek. Ezt a két kompartmentumot mindeddig nem tudtuk sem molekuláris markerek, sem *in vivo* riporterek segítségével külön választani. Ezt magyarázhatja az a laborunkban tett megfigyelés, mely szerint a naív lárvában a szesszilis szövetből sejtek lépnek a keringésbe, illetve keringő sejtek tapadnak ki a testfalhoz (közöletlen adat). Hasonló folyamat játszódik le a szesszilis sejtek óvatos fizikai mobilizációja során: a szesszilis vérsejtek leválását követően a mobilizálódott sziget újraformálódik a keringésből származó sejtekből (Makhijani és mtsai., 2011).

A kardiogén mezodermából származó vérsejteket a naív lárvában kizárólag a központi nyirokszervben figyeltünk meg. Mivel ebben a kompartmentumban nem találtunk embrionális makrofág eredetű sejtet, arra következtettünk, hogy a naív lárvában a központi nyirokszerv sejtjei nem kerülnek a keringésbe, és a keringő sejtek sem lépnek be a nyirokszervbe.

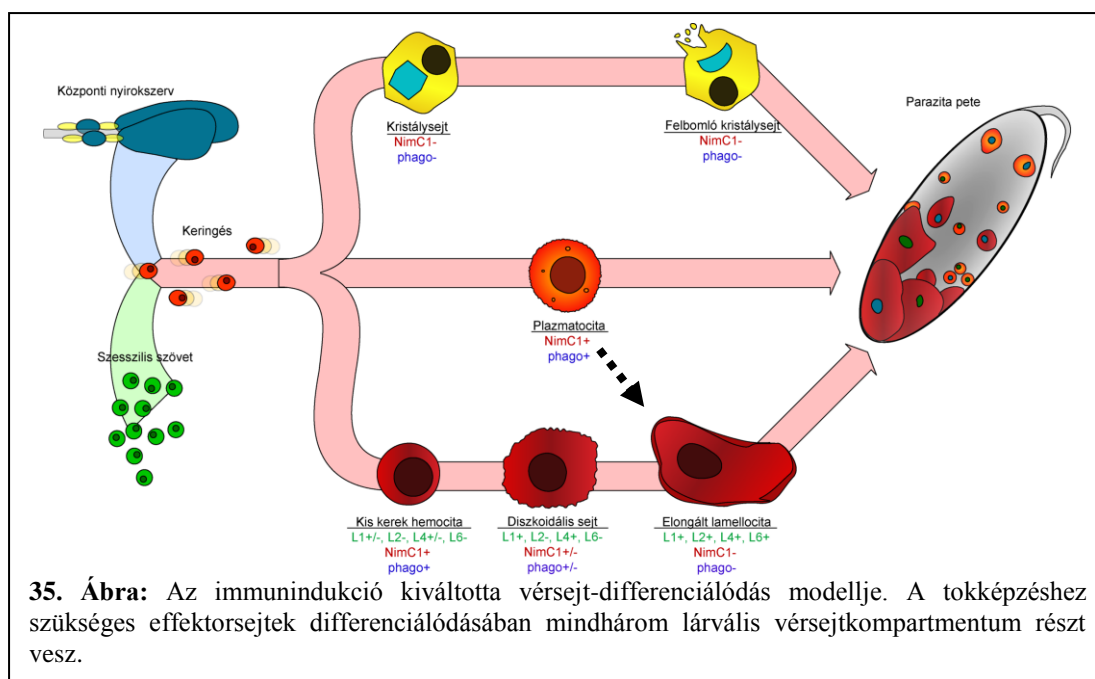
Parazitoid darázs által kiváltott immunindukciót követően mindkét sejtvonal részt vesz az effektor sejttypusok differenciálódásában; mind a plazmatociták, mind a lamellociták között azonosítottunk a központi nyirokszervből (*Dot*-sejtvonalból), valamint a keringésből és a szesszilis szövetből (*crq*-sejtvonalból) származó sejteket. Megfigyeltünk olyan, a *Dot*-leszármazási vonalból származó, plazmatocitáknál kisebb, differenciálódási markereket ki nem fejező vérsejteket is, melyekről feltételezzük, hogy a nyirokszerv szerkezetének felbomlásakor, a differenciálódási programjuk befejezése előtt jutottak a lárvák keringésébe.

Eredményeink közvetlen bizonyítékot szolgáltatottak arra, hogy – a korábbi elképzelésekkel ellentétben (Sorrentino és mtsai., 2002; Minakhina és Steward, 2010)

- az immunindukciót követően differenciálódó lamellociták nem kizárólag a központi nyirokszervben található őssejtekből képződnek, és egyúttal megerősítik Márkus Róbertnek és munkatársainak 2009-ben közölt eredményeit, mely szerint a központi nyirokszervtől fizikailag elzárt testrészből, a szesszilis vérsejtképző szövetből és a keringésből is származnak lamellociták.

A központi nyirokszervben történő vérsejtdifferenciálódást több munkacsoport is részletekbe menően vizsgálta. Eredményeik alapján megállapítható, hogy a központi nyirokszerv funkcionális zónái egymásra hatva szabályozzák a vérsejtképzés ütemét (Sorrentino és mtsai., 2002; Lebestky és mtsai., 2003; Krzemien és mtsai., 2007; Mandal és mtsai., 2007; Krzemien és mtsai., 2010; Mukherjee és mtsai., 2011; Sinenko és mtsai., 2011), valamint az is megállapítható, hogy a szisztémás jelek (inzulin, GABA) is befolyásolják a központi nyirokszervben végbemenő vérképzést (Shim és mtsai., 2012; Shim és mtsai., 2013). Hasonló szabályozási folyamatokat a keringésben és a szesszilis szövetben mindeddig nem azonosítottak. Ezért is különösen érdekes, hogy ezek a különböző embrionális eredetű, és potenciálisan külön szabályzás alatt álló kompartmentumok együttesen vesznek részt az immunválaszt követő effektor hemociták képződésében (**35. Ábra**).

Laboratóriumunkban előzetes eredmények alapján azt is megállapítottuk, hogy a keringésben az immunindukciót követően először a *crq*-leszármazási vonalból származó lamellociták fedezhetők fel, míg később a központi nyirokszerv-eredetű (*Dot*-sejtvonalból származó) tokképző sejtek is megjelennek, ami arra utal, hogy a központi nyirokszervben lezajló vérsejt differenciálódás késésben van a keringéshez és a szesszilis szövethez képest (közvetlen adat).



Eredményeink arra is rávilágítanak, hogy a korábban terminálisan differenciálódottnak tekintett plazmatociták immunindukció hatására képesek lamellocitává alakulni. A plazmatociták plaszticitására először 1957-ben Rizki utalt, azonban feltételezéseit kizárólag morfológiai elemzésre alapozta, és mivel további, döntő erejű kísérleteket nem publikált ebben a kérdésben, az általa felvázolt modell feledésbe merült. Kísérleteinkben plazmatociták és lamellociták közti átmeneti sejteket figyeltünk meg, melyek fokozatos morfológiai, markerkifejeződési és funkcionális változáson esnek át. Az általunk vizsgált sejteket összevetve Rizki 1957-es közleményében található illusztrációkon szereplő hemocitákkal, azonosíthatjuk az általa is átmeneti formának tekintett diszkoidális vérsajteket.

Az Eredmények **4.1** és **4.2** fejezeteiből készült publikáció (Honti és mtsai., 2010) megjelenését követően a levont konklúzióinkat két további, független közlemény is megerősítette (Avet-Rochex és mtsai., 2010; Stofanko és mtsai., 2010).

A kristálysejt-leszármazási vonalat az immunindukciót követően megvizsgálva (*lz*-sejtvonal) nem tapasztaltuk a plazmatocitákra jellemző plaszticitást. A *hop*<sup>Tum</sup> tumoros mutáns lárvákban sem tapasztaltuk a *lz*-sejtvonal lamellocita

irányba történő transzformációját. Ez különösen azért érdekes, mert munkacsoportunkban immunológiai markerek és funkcionális vizsgálatok (*in vivo* fagocitózis-teszt) segítségével kimutattuk, hogy a *l<sub>z</sub>*-leszármazási vonalat alkotó vörsejtek hozzávetőleg negyede plazmatocita.

A használt sejtvonaljelölő rendszer nyújtotta lehetőséget kihasználva a *l<sub>z</sub>*-sejtvonalban olyan faktorokat fejeztettünk ki, melyekről korábban leírták, hogy a tokképző sejtek képződését indukálják (Zettervall és mtsai., 2004, Stofanko és mtsai., 2010): az Alk és a Hep fehérjék konstitutívan aktív formáját, valamint a Chn epigenetikai regulátort. Mindhárom esetben lamellocita differenciálódást figyeztünk meg a kristálysejt-leszármazási vonalból. Ez a korábbi eredményeinkkel való ellentmondás megmagyarázható azzal, hogy az immunindukció és a tumor által kiváltott aktivációs jelekre – bizonyos szignáltranszdukciós komponensek expressziójának hiánya miatt - a *l<sub>z</sub>*-sejtvonal érzéketlen, azonban az általunk megvizsgált faktorok egy alacsonyabb szabályozási szinten működnek.

Az Alk.act túltermelése esetén mind *l<sub>z</sub>*-leszármazási vonalból, mind nem jelölt hemocitákból differenciálódnak lamellociták, ami arra enged következtetni, hogy az Alk jelátvitel aktivációja nem-sejtautonóm módon is indukálja a vörsejtdifferenciálódást. Ezzel szemben a Hep aktivált formájának, illetve a Chn fehérjének a *l<sub>z</sub>*-sejtvonalban való túltermelése elsősorban a sejtvonalon belül – sejtautonóm módon – indukálnak lamellocita differenciálódást. A jelenség hátterében valószínűleg többlépcsős szabályozási folyamatok állnak: ismert például, hogy a JAK/STAT jelátviteli út működése során a sejtek autoregulációs mechanizmusok következtében Upd3 ligandot termelnek és szekretálnak, ami nem csak fenntartja a szignalizáció aktivitását, hanem további sejteket is aktiválhat (Agaisse és Perrimon, 2004; Pastor-Pareja és mtsai., 2008). A Hep konstitutívan aktív formájának

kifejeztetése során tapasztalt, a *lz*-sejtvonaltól függetlenül bekövetkező lamellocita differenciálódás (amelyet a lamellociták 21%-ánál figyeltünk meg) magyarázata lehet, hogy a meghajtóelem nem csak vérsejtekben, hanem egyéb szövetekben (pl. szem-antenna imágókorong) is aktív. Kontrollkísérletekben megfigyeltük, hogy az *UAS-FLP*, *lz-GAL4/+*; *AFG/UAS-hep.ca* genotípusú felnőtt állatok szemei sejtpusztulására jellemző fenotípust mutatnak, ami Jun-jelátvitel indukálta apoptózisra utal. Mivel az imágókorongokban lezajló, Jun vezérelte apoptózis kiválthatja a lamellociták differenciálódását (Pastor-Pareja és mtsai., 2008), feltételezzük, hogy kísérleteinkben is ez indukálhatta a *lz*-sejtvonaltól független lamellocita érést.

A *Chn* kifejeztetés esetében tapasztalt sejtautonóm válasz magyarázata lehet, hogy a *Chn* (ezáltal valószínűleg a CoREST komplex is) a lamellocita differenciálódás közvetlen aktivátorait szabályozza. Mivel a CoREST komplexet mint represszort írták le, elképzelhető, hogy ebben az esetben a megfigyelt fenotípus egy anti-represszor hatás következménye.

A *lz*-sejtvonal vizsgálata során levont konklúzióink ellentmondásba kerültek a Stofanko és munkatársai által 2010-ben közölt eredményekkel, melyek szerint a *lz-GAL4*-et kifejező sejteket transzgenikus konstrukciók segítségével (például az általunk is vizsgált *UAS-chn* elemmel) sem lehet lamellocita irányba differenciáltatni. Az ellentmondás egy lehetséges feloldása az általunk használt sejtvonaljelölő rendszerben keresendő: a konstitutív *GAL4* forrás az aktiválást követően a génexpressziós változásoktól függetlenül működik. Tehát ha a *lz* kifejeződés a transzgén hatására csökken, vagy teljesen megszűnik, úgy az önmagában alkalmazott *lz-GAL4* meghajtóelem esetében a transzgén expresszió is lecseng, ám a *lz*-sejtvonaljelölés esetében a *lz-GAL4* expresszió nem szűnik meg, így a kifejeztetett faktor aktivitása is fennmarad.

## 5.2 A vérsejtek sorsa a lárva-báb-adult átmenet során

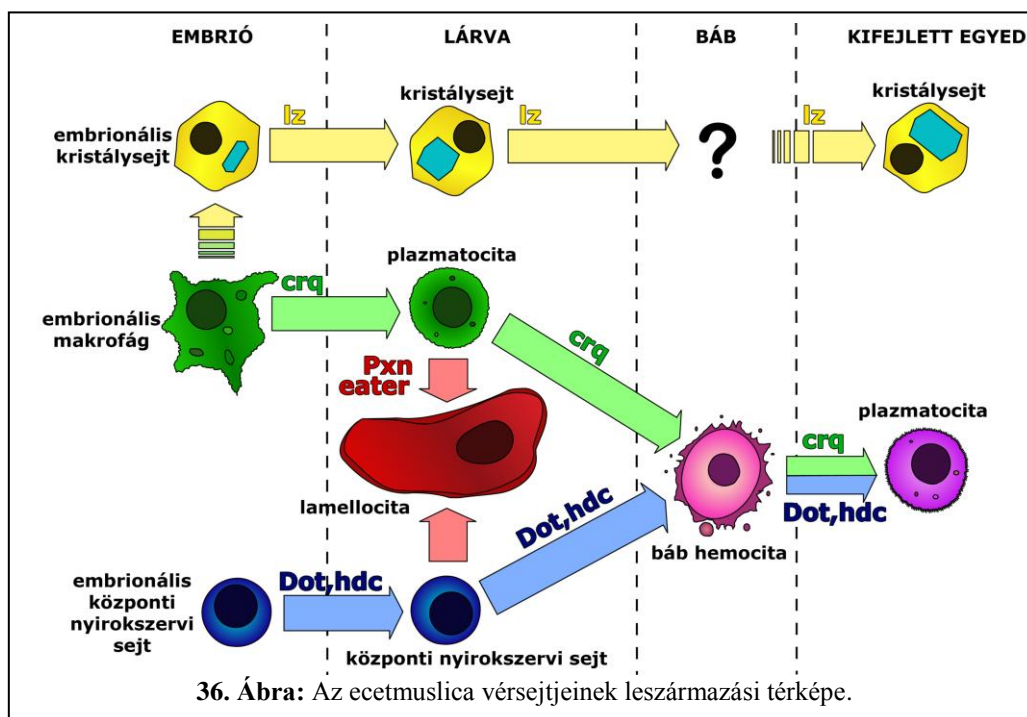
A bábozódás során végbemenő szöveti átrendeződéskor a lárvális sejtek jelentős része elpusztul. Korábban feltételezték, hogy a sejtpusztulás hatására bekövetkező vérsejttaktiváció szükséges ahhoz, hogy a bábban lezajló fejlődési folyamatok rendben végbemenjenek (Lanot és mtsai., 2001). Újabb eredmények azonban rámutattak, hogy késői lárvális stádiumban a fejlődést egyáltalán nem befolyásolja a teljes vérsejtkészlet kiirtása, azonban a vérsejthiányos kikelő adult állatok jelentős immunhiányos fenotípust mutatnak, és emiatt csak néhány napig élnek (Charroux és Royet, 2009).

Kísérleteink rávilágítottak arra, hogy a bábozódáskor az immobilis immunkompartmentumok szerkezete felbomlik. A központi nyirokszerv esetében ezt a jelenséget már korábban leírták; a korai bábban a nyirokszervet alkotó vérsejtek szekretált metalloproteázok segítségével elemésszik a lebonyeget körülvevő bazális membránt, majd elhagyják a kompartmentumot (Grigorian és mtsai., 2011).

A szesszilis szövet esetében fluoreszcens sztereomikroszkópia segítségével követtük végig a bábozódás során bekövetkező szöveti átrendeződést. Megfigyeltük, hogy a szesszilis vérsejtkompartmentum sejtjei a keringésbe jutnak; ezek a sejtek feltehetőleg a bábban keletkező sejtörmeléket fagocitálják. Azt is megállapítottuk, hogy a késői bábban az adulta jellemző mintázatú szesszilis szövet alakul ki.

A *Dot*- és *crq* leszármazási vonalak követésével megvizsgáltuk a lárvális kompartmentumokat alkotó sejtek sorsát a lárva-báb-adult átmenet során. Kísérleteink rávilágítottak arra, hogy a bábállapot alatt, valamint a kifejlett egyedben a vérsejtkészlet vegyes eredetű. Márkus Róbert PhD munkájából azt is tudjuk, hogy a kifejlett állatban - sem naív, sem mechanikai behatásokkal indukált egyedekben - nem

figyelhető meg vérsjtképződés. Ez magyarázhatja az "immunszenescencia" jelenségét is; irodalmi adatok szerint a vérsjtszám, ezáltal a mikróbákkal szemben mutatott ellenálló képesség az állatok öregedésével folyamatosan csökken (Mackenzie és mtsai., 2011). Ennek a jelenségnek az lehet az evolúciós magyarázata, hogy a muslica a bábból történő kibújását követően néhány órán belül már képes a szaporodásra, és hosszú távon nincs szüksége jól működő – és komoly energiaráfordítást igénylő - immunrendszerre.



A 4.1, 4.2 és 4.3 fejezetekben bemutatott eredmények alapján összeállítottuk az ecetmuslica vérsjtek leszármazási térképét az embrió-stádiumtól a kifejlett állatig. A modellünk szerint az embrióális leszármazási vonalak a lárva stádiumban is egymástól függetlenül fejlődnek, azonban a sejtes immunválasz során együtt vesznek részt a parazita elpusztításában. Ez az immunválasz a plazmatociták lamellocitákká történő alakulását indukálja, míg a kristálysejt-leszármazási vonalban ilyen transzformáció nem játszódik le.

A bábozódást követően az embrionális makrofág, valamint az embrionális központi nyirokszerv eredetű sejtek elszigetelődése mindenképp megszűnik, ugyanis a belőlük felépülő vérsejtkompartmentumok felbomlanak. Ezen sejtek közül származik az a vérsejt populáció, amely a báb-állapot végéig megmaradva alkotja az adult vérsejtkészletét (Honti és mtsai., 2014, **36. Ábra**).

### **5.3 A vérsejtkompartmentumok vizsgálatának új módszere**

Laboratóriumunkban korábban részletesen jellemeztük a lárva vérsejtképző szöveteit, különös tekintettel a szesszilis szövetre (Márkus és mtsai., 2009; Honti és mtsai., 2010). A jellemzéshez szükséges kísérleti módszerek azonban jelentősen roncsolták a szövetet, ami megnehezítette annak megállapítását, hogy külső (fizikai behatás, parazitózis), vagy belső (tumorok, vérsejtképzést érintő mutációk) hatásokra miként változik meg annak szerkezete.

Létrehoztunk egy új vizsgálati módszert, amely lehetővé teszi immobilizált, *in vivo* riportert kifejező lárvák konfokális videomikroszkópiával történő megfigyelését. Munkánk során a vérsejtképző kompartmentumokat (elsősorban a szesszilis vérsejtképző szövetet) vizsgáltuk, azonban a metódus más szervrendszerek (trachea, idegrendszer, bél) esetében is alkalmazható, sőt, a rendelkezésre álló GAL4/UAS és a Q rendszerekkel együtt alkalmazva (Potter és mtsai., 2010) akár három független fluoreszcens kifejeződési mintázat is követhető az élő állatban.

Az *in vivo* reporter konstrukciókat és a rendelkezésünkre álló molekuláris markereket kombinálva kettős jelölést végeztünk az élő lárvák szesszilis szövetének sejtjein, ami lehetővé tette a szesszilis szövet minden eddignél finomabb felbontású vizsgálatát (Csordás és mtsai., 2014). A rendszer felhasználásával megvizsgáltuk az *l(3)mbn<sup>1</sup>* tumoros mutáns lárvák szesszilis vérképző kompartmentumát, és



megállapítottuk, hogy az a vad típusú lárváéhoz képest jelentősen kiterjed. Az *l(3)mbn<sup>1</sup>* mutáns jellemzése során kapott eredmények bizonyítják, hogy kísérleti rendszerünk alkalmas a vérsejtképző kompartmentumokra ható mutációk - például tumoros transzformációk - fenotipikus jellemzésére.

Mivel az *in situ* immunfluoreszcens jelölés végrehajtása egyszerű, és vizsgálatához nem feltétlenül szükséges konfokális mikroszkóp, hasznos eszköznek bizonyulhat a vérsejtkompartimentumok jellemzésén túlmutató vizsgálatokban is, legyen az az ecetmuslica lárvája, vagy akár olyan rovar faj (*Bombyx mori*, *Manduca sexta*, *Anopheles gambiae*), ahol nem áll rendelkezésre a *Drosophilában* rutinszerűen használt transzgenikus rendszerek tárháza.

## 6. Az eredmények összefoglalása

Az *ecetmuslica* vérsejtképződése - az emlősökéhez hasonlóan - több hullámban, hematopoietikus kompartmentumokhoz kötve zajlik. Az embrionális fejlődési állapotban a mezoderma két, jól körülhatárolható részének sejtjeiben aktiválódnak a vérsejtprimordiumok kialakulásához szükséges gének. A feji mezodermából jönnek létre az embrionális makrofágok és kristálysejtek, míg a kardiogén mezodermából a központi nyirokszerv differenciálódik.

Kísérleteinkben egy olyan transzgenikus rendszert hoztunk létre, amellyel követtük az embrionális vérsejtleszármazási vonalakat a későbbi fejlődési stádiumokban. Megállapítottuk, hogy az embrionális makrofágok utódsejtjeiből alakulnak ki a lárva keringő vérsejtjei, valamint a szesszilis vérsejtképző szövet, a kardiogén mezodermából eredő központi nyirokszerv pedig ezen két kompartmentumtól izoláltan fejlődik. Parazitoid darázs által kiváltott immunindukciót követően mindhárom hematopoietikus szövet részt vesz az effektor sejtek (plazmatociták és lamellociták) differenciálódásában.

Részletesen jellemeztük az immunindukciót követő differenciálódási folyamatokat. Megfigyeltük, hogy a lamellocita-markereket kifejező sejtek a parazitózist követően néhány órával megjelennek a lárva keringésében. Ezek a sejtek mind morfológiai, mind funkcionális kritériumokat figyelmebe véve átmenetet képeznek a fagocitáló plazmatociták és a tokképző lamellociták között. Ezt a feltételezett átalakulást (a plazmatociták plaszticitását) a plazmatocita leszármazási vonal *in vivo* kijelölésével is megerősítettük: sejtvonaltjelölő transz géneket hordozó lárvák immunindukcióját követően megfigyeltünk olyan lamellocitákat, melyek a plazmatocita-sejtvonalból származtak.

A kristálysejtek a naív állatok keringésében is jelen vannak, és az immunindukció során bekövetkező melanizációban játszanak szerepet. A kristálysejtle származási vonal kijelölésével és követésével kimutattuk, hogy a plazmatocitákkal ellentétben ezek a sejtek nem képesek lamellocitákká alakulni a parazitoid darázs fertőzését követően. Megfigyeltük azonban, hogy a differenciálódást közvetlenül befolyásoló faktorok kifejeztetésével ebből a le származási vonalból is képesek lamellociták kialakulni. Ez a differenciálódási folyamat a kifejeztetett faktortól függően végbemehet mind sejtautonóm, mind nem-sejtautonóm módon.

A lárvális stádium végén megindul a helyhez kötött vérsejtkompartmentumok spontán dezintegrációja. A folyamatot fluoreszcens riporterekkel követve megállapítottuk, hogy a központi nyirokszerv mellett a szesszilis vérsejtképző szövet szerkezete is felbomlik. A késői bábban megfigyeltük ezen kompartmentum újrendeződését az adultokra jellemző mintázatban.

Az embrionális le származási vonalakat *in vivo* sejtvonaljelöléssel végigkövetve azt is kimutattuk, hogy a báb és az adult keringő vérsejtjei egyaránt származnak a feji és a kardiogén mezodermából, vagyis elmondható, hogy az adult vérsejtek létrehozásában mindhárom lárvális vérsejtkompartmentum részt vesz.

A bemutatott eredményekből létrehoztunk egy modellt a parazitoid által kiváltott immunválasz során történő differenciálódási folyamatok leírására, valamint felvázoltuk az ecetmuslica vérsejtek le származási térképét, mellyel a hemociták sorsa végigkövethető az embrionális fejlődési stádiumtól a kifejlett egyedig.

Az elmúlt években sokat fejlődtek a konfokális képalkotó módszerek, így lehetővé vált az élő állatok nagyfelbontású vizsgálata. Mivel a lárva szesszilis vérsejtképző szövetének szerkezete jelentősen sérül a preparáláskor, létrehoztunk egy

új, *in vivo* kísérleti elrendezést, amelyben természetes állapotában vizsgálható a vérképző kompartmentumok szerkezete fluoreszcens riporterek segítségével. Módszerünk alapját a lárvák reverzibilis megbénítása képezi, amellyel akár órás időtartamú videómikroszkópos felvételek is készíthetők. Az *in vivo* riporterek nyújtotta előnyöket összekötöttük a vérsejt specifikus markerek felhasználásával, melynek során a lárvába injektálható, fluoreszcensen jelölt, vérsejt specifikus ellenanyagkeverékeket hoztunk létre. Konfokális mikroszkópos vizsgálatokkal megerősítettük a módszer specifitását, és az élő állatok vérsejtképző kompartmentumaiban azonosítottuk az egyes vérsejtpopulációkat. A módszer használatával a jövőben szeretnénk jellemezni a vérsejtképző kompartmentumok dinamikáját az élő állatban, valamint megvizsgálni a hematopoézist befolyásoló faktorok hatását a vérképző szövetekre.

## 7. Summary of the results

In *Drosophila melanogaster*, the differentiation of hemocytes begins in the early embryonic stages. Two distinct mesodermal segments give rise to two independent embryonic hemocyte lineages: the procephalic mesoderm differentiates into embryonic macrophages and crystal cells, while the cardiogenic mesoderm forms the embryonic lymph gland. In the larval stages, hemocytes occupy three hematopoietic compartments: the lymph gland, the sessile tissue and the circulation.

In our experiments, we created a transgenic system, which enabled us to follow the embryonic hemocyte lineages in later developmental stages. We established that the larval circulation and sessile tissue can be traced back to the embryonic macrophage-lineage, while the lymph gland arises from the cardiogenic mesoderm. Our experiments revealed that in naive larvae, no cells exit or enter the lymph gland; however, upon immune induction by parasitic wasp, all three hematopoietic compartments take part in the differentiation of effector hemocytes, namely plasmatocytes and lamellocytes.

We performed the detailed analysis of the hemocyte differentiation that follows the immune challenge. We observed hemocytes expressing lamellocytes specific markers just few hours after the induction. These cells represent an intermediate stage of differentiation between phagocytic plasmatocytes and encapsulating lamellocytes from both morphological, immunological and functional standpoint. We investigated this presumed transformation by tracking the fate of the plasmatocyte lineage *in vivo*, and found lamellocytes of clearly plasmatocyte origin in the parasite-infested larvae. From these results, we determined that in the course of

the immune response, at least part of the lamellocyte differentiation can be attributed to phenomenon of macrophage plasticity.

Crystal cells are present in the circulation of naive larvae, and play a key role in the melanization processes following the immune challenge. By tracing the crystal cell lineage *in vivo*, we found that, unlike plasmatocytes, these cells do not transform into lamellocytes after parasitoid immune induction. However, we observed that by expressing factors, which directly induce the differentiation of effector blood cells, lamellocytes can be differentiated from the crystal cell lineage. The differentiation can be either cell autonomous, or non-cell autonomous, depending on the expressed factors.

The onset of pupariation triggers the spontaneous desintegration of the immobile hemocyte compartments. By tracking these changes with fluorescent reporters, we found that - similarly to the lymph gland - the structure of the sessile hematopoietic tissue also dissolves. In late pupae, we observed the rearrangement of this compartment in a pattern that resembles the adult stage.

With tracing of the embryonic hemocyte lineages, we also showed that pupal and adult hemocytes derive from both the procephalic mesoderm (embryonic macrophage-lineage) and the cardiogenic mesoderm (embryonic lymph gland-lineage), which also means that all three larval hemocyte compartments contribute to the adult blood cell pool.

From the presented data, we constructed a model to summarize the differentiation events that take place in response to parasitoid wasp infection. We augmented this model with further data to establish a genealogical map of hemocytes, which helps tracking the fate of the individual blood cell types and compartments during the development of *Drosophila*.

In recent years, confocal imaging techniques took a huge leap forwards, therefore it became possible to investigate live animals in great detail. Since the structure of the sessile hematopoietic tissue is severely damaged during the preparation of the larva, we created an *in vivo* method, by which the fine structure and composition of the hematopoietic tissues can be studied with fluorescent reporters. The basis of this method is the reversible immobilization of larvae, which allows in excess of an hour of videomicroscopic investigation. We combined the strength of the *in vivo* reporters with the specificity of molecular markers by injecting fluorescently labeled antibody-mixtures into live animals to create an *in situ* immunostaining assay. We confirmed the specificity of this technique by confocal microscopic experiments, and we identified different hemocyte types within the sessile compartment. Through the use of this method, we plan to characterize the dynamics of the hemocyte compartments in live larvae, and investigate the effect of different factors on the hemocyte compartments that regulate hematopoiesis in *Drosophila melanogaster*.

## 8. Referenciák

- Adachi-Yamada, T., Fujimura-Kamada, K., Nishida, Y., Matsumoto, K., 1999. Distortion of proximodistal information causes JNK-dependent apoptosis in *Drosophila* wing. *Nature* 400, 166–169.
- Agaisse, H., Perrimon, N., 2004. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol. Rev.* 198, 72–82.
- Albrecht, S., Wang, S., Holz, A., Bergter, A., Paululat, A., 2006. The ADAM metalloprotease Kuzbanian is crucial for proper heart formation in *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Development* 123, 372–387.
- Avet-Rochex, A., Boyer, K., Polesello, C., Gobert, V., Osman, D., Roch, F., Augé, B., Zanet, B.J., Haenlin, M., Waltzer, L., 2010. An in vivo RNA interference screen identifies gene networks controlling *Drosophila melanogaster* blood cell homeostasis. *BMC. Dev. Biol.* 10, 65.
- Babcock, D.T., Brock, A.R., Fish, G.S., Wang, Y., Perrin, L., Krasnow, M.A., Galko, M.J., 2008. Circulating blood cells function as a surveillance system for damaged tissue in *Drosophila* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (29), 10017–10022.
- Bataillé, L., Augé, B., Ferjoux, G., Haenlin, M., Waltzer, L., 2005. Resolving embryonic blood cell fate choice in *Drosophila* : interplay of GCM and RUNX factors. *Development* 132 (20), 4635–4644.
- Bausek, N., Zeidler, M.P., 2014. Gα73B is a downstream effector of JAK/STAT signalling and a regulator of Rho1 in *Drosophila* haematopoiesis. *J. Cell. Sci.* 127, 101–110.
- Bidla, G., Dushay, M.S., Theopold, U., 2007. Crystal cell rupture after injury in *Drosophila* requires the JNK pathway, small GTPases and the TNF homolog Eiger. *J. Cell. Sci.* 120 (Pt 7), 1209–1215.
- Bina, S., Wright, V.M., Fisher, K.H., Milo, M., Zeidler, M.P., 2010. Transcriptional targets of *Drosophila* JAK/STAT pathway signalling as effectors of haematopoietic tumour formation. *EMBO Rep.* 11, 201–207.
- Binari, R., Perrimon, N., 1994. Stripe-specific regulation of pair-rule genes by hopscotch, a putative Jak family tyrosine kinase in *Drosophila*. *Genes Dev.* 8, 300–312.
- Binggeli, O., Neyen, C., Poidevin, M., Lemaitre, B., 2014. Prophenoloxidase Activation Is Required for Survival to Microbial Infections in *Drosophila*. *PLoS Pathog* 10.
- Brand, A.H., Perrimon, N., 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118 (2), 401–415.



- Brennan, C.A., Delaney, J.R., Schneider, D.S., Anderson, K.V., 2007. Psidin is required in *Drosophila* blood cells for both phagocytic degradation and immune activation of the fat body. *Curr. Biol.* 17 (1), 67–72.
- Brückner, K., Kockel, L., Duchek, P., Luque, C.M., Rorth, P., Perrimon, N., 2004. The PDGF/VEGF receptor controls blood cell survival in *Drosophila*. *Dev. Cell.* 7 (1), 73–84.
- Buenzow, D.E., Holmgren, R., 1995. Expression of the *Drosophila* gooseberry locus defines a subset of neuroblast lineages in the central nervous system. *Dev. Biol.* 170, 338–349.
- Carton, Y., Boulétreau, M., 1985. Encapsulation ability of *Drosophila melanogaster*: a genetic analysis. *Dev. Comp. Immunol.* 9, 211–219.
- Carton, Y., Nappi, A.J., 1997. *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* 13, 218–227.
- Chand, D., Yamazaki, Y., Ruuth, K., Schönherr, C., Martinsson, T., Kogner, P., Attiyeh, E.F., Maris, J., Morozova, O., Marra, M.A., Ohira, M., Nakagawara, A., Sandström, P.-E., Palmer, R.H., Hallberg, B., 2013. Cell culture and *Drosophila* model systems define three classes of anaplastic lymphoma kinase mutations in neuroblastoma. *Dis Model Mech* 6, 373–382.
- Charroux, B., Royet, J., 2009. Elimination of plasmacytes by targeted apoptosis reveals their role in multiple aspects of the *Drosophila* immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106 (24), 9797–9802.
- Chung, Y.S., Kocks, C., 2011. Recognition of pathogenic microbes by the *Drosophila* phagocytic pattern recognition receptor eater. *J. Biol. Chem.* 286 (30), 26524–26532.
- Crew, J.R., Batterham, P., Pollock, J.A., 1997. Developing compound eye in lozenge mutants of *Drosophila*: lozenge expression in the R7 equivalence group. *Dev Gene Evol* 206, 481–493.
- Crozatier, M., Ubeda, J.M., Vincent, A., Meister, M., 2004. Cellular immune response to parasitization in *Drosophila* requires the EBF orthologue collier. *PLoS Biol.* 2(8), E196.
- Csordás, G., Varga, G.I.B., Honti, V., Jankovics, F., Kurucz, É., Andó, I., 2014. In vivo immunostaining of hemocyte compartments in *Drosophila* for live imaging. *PLoS ONE* 9, e98191.
- Defaye, A., Evans, I., Crozatier, M., Wood, W., Lemaitre, B., Leulier, F., 2009. Genetic ablation of *Drosophila* phagocytes reveals their contribution to both development and resistance to bacterial infection. *J. Innate Immun.* 1 (4), 322–334.
- Duffy, J.B., 2002. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34, 1–15.

- Elrod-Erickson, M., Mishra, S., Schneider, D., 2000. Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 10 (13), 781–784.
- Evans, C.J., Hartenstein, V., Banerjee, U., 2003. Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. *Dev. Cell.* 5 (5), 673–690.
- Evans, C.J., Olson, J.M., Ngo, K.T., Kim, E., Lee, N.E., Kuoy, E., Patananan, A.N., Sitz, D., Tran, P., Do, M.T., Yackle, K., Cespedes, A., Hartenstein, V., Call, G.B., Banerjee, U., 2009. G-TRACE: rapid Gal4-based cell lineage analysis in *Drosophila*. *Nat. Methods* 6 (8), 603–605.
- Evans, I.R., Hu, N., Skaer, H., Wood, W., 2010. Interdependence of macrophage migration and ventral nerve cord development in *Drosophila* embryos. *Development* 137 (10), 1625–1633.
- Ferjoux, G., Augé, B., Boyer, K., Haenlin, M., Waltzer, L., 2007. A GATA/RUNX cis-regulatory module couples *Drosophila* blood cell commitment and differentiation into crystal cells. *Dev. Biol.* 305 (2), 726–734.
- Fossett, N., 2013. Signal transduction pathways, intrinsic regulators, and the control of cell fate choice. *Biochim. Biophys. Acta* 1830 (2), 2375–2384.
- Fossett, N., Tevosian, S.G., Gajewski, K., Zhang, Q., Orkin, S.H., Schulz, R.A., 2001. The friend of GATA proteins U-shaped, FOG-1, and FOG-2 function as negative regulators of blood, heart, and eye development in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (13), 7342–7347.
- Franc, N.C., Dimarcq, J.L., Lagueux, M., Hoffmann, J., Ezekowitz, R.A., 1996. Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* 4 (5), 431–443.
- Franc, N.C., Heitzler, P., Ezekowitz, R.A., White, K., 1999. Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Science* 284 (5422), 1991–1994.
- Fujita, Y., Nagaosa, K., Shiratsuchi, A., Nakanishi, Y., 2012. Role of NPxY motif in Draper-mediated apoptotic cell clearance in *Drosophila*. *Drug Disc. Ther.* 6 (6), 291–297.
- Gao, H., Wu, X., Fossett, N., 2011. Odd-skipped maintains prohemocyte potency and blocks blood cell development in *Drosophila*. *Genesis* 49 (3), 105–116.
- Giordano, E., Rendina, R., Peluso, I., Furia, M., 2002. RNAi triggered by symmetrically transcribed transgenes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 160, 637–648.
- Goto, A., Kadowaki, T., Kitagawa, Y., 2003. *Drosophila* hemolectin gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects. *Dev. Biol.* 264 (2), 582–591.

- Grigorian, M., Mandal, L., Hartenstein, V., 2011. Hematopoiesis at the onset of metamorphosis: terminal differentiation and dissociation of the *Drosophila* lymph gland. *Dev. Genes. Evol.* 221 (3), 121–131.
- Hanratty, W.P., Dearolf, C.R., 1993. The *Drosophila* Tumorous-lethal hematopoietic oncogene is a dominant mutation in the hopscotch locus. *Mol. Gen. Genet.* 238, 33–37.
- Hanratty, W.P., Ryerse, J.S., 1981. A genetic melanotic neoplasm of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 83, 238–249.
- Hedengren, M., Asling, B., Dushay, M.S., Ando, I., Ekengren, S., Wihlborg, M., Hultmark, D., 1999. Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*. *Mol. Cell* 4, 827–837.
- Holz, A., Bossinger, B., Strasser, T., Janning, W., Klapper, R., 2003. The two origins of hemocytes in *Drosophila*. *Development* 130 (20), 4955–4962.
- Honti, V., Csordás, G., Márkus, R., Kurucz, É., Jankovics, F., Andó, I., 2010. Cell lineage tracing reveals the plasticity of the hemocyte lineages and of the hematopoietic compartments in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Immunol.* 47 (11–12), 1997–2004.
- Honti, V., Kurucz, É., Csordás, G., Laurinyecz, B., Márkus, R., Andó, I., 2009. In vivo detection of lamellocytes in *Drosophila melanogaster*. *Immunol. Lett.* 126 (1–2), 83–84.
- Horn, L., Leips, J., Starz-Gaiano, M., 2014. Phagocytic ability declines with age in adult *Drosophila* hemocytes. *Aging Cell* 13, 719–728.
- Hultmark, D., 1994. Insect immunology. Ancient relationships. *Nature* 367, 116–7.
- Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y., Yamamoto, D., 1997. The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* 124, 761–771.
- Jankovics, F., Brunner, D., 2006. Transiently reorganized microtubules are essential for zippering during dorsal closure in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Cell* 11, 375–385.
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 211, 213–236.
- Jung, S.H., Evans, C.J., Uemura, C., Banerjee, U., 2005. The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development* 132 (11), 2521–2533.
- Kimbrell, D.A., Hice, C., Bolduc, C., Kleinhesselink, K., Beckingham, K., 2002. The Dorothy enhancer has Tinman binding sites and drives hopscotch-induced tumor formation. *Genesis* 34 (1–2), 23–28.

- Kocks, C., Cho, J.H., Nehme, N., Ulvila, J., Pearson, A.M., Meister, M., Strom, C., Conto, S.L., Hetru, C., Stuart, L.M., Stehle, T., Hoffmann, J.A., Reichhart, J.M., Ferrandon, D., Rämét, M., Ezekowitz, R.A., 2005. Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell* 123 (2), 335–346.
- Konrad, L., Becker, G., Schmidt, A., Klöckner, T., Kaufer-Stillger, G., Dreschers, S., Edström, J.E., Gateff, E., 1994. Cloning, structure, cellular localization, and possible function of the tumor suppressor gene lethal(3)malignant blood neoplasm-1 of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 163 (1), 98–111.
- Kroeger Jr, P.T., Tokusumi, T., Schulz, R.A., 2012. Transcriptional regulation of eater gene expression in *Drosophila* blood cells. *Genesis* 50 (1), 41–49.
- Krzemien, J., Dubois, L., Makki, R., Meister, M., Vincent, A., Crozatier, M., 2007. Control of blood cell homeostasis in *Drosophila* larvae by the posterior signalling centre. *Nature* 446 (7133), 325–328.
- Krzemien, J., Oyallon, J., Crozatier, M., Vincent, A., 2010. Hematopoietic progenitors and hemocyte lineages in the *Drosophila* lymph gland. *Dev. Biol.* 346 (2), 310–319.
- Kurant, E., Axelrod, S., Leaman, D., Gaul, U., 2008. Six-microns-under acts upstream of Draper in the glial phagocytosis of apoptotic neurons. *Cell* 133 (3), 498–509.
- Kurata, S., 2010. Fly immunity: recognition of pathogens and induction of immune responses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 708, 205–217.
- Kurucz, É., Márkus, R., Zsámboki, J., Folkl-Medzihradsky, K., Darula, Z., Vilmos, P., Udvardy, A., Krausz, I., Lukacsovich, T., Gateff, E., Zettervall, C.J., Hultmark, D., Andó, I., 2007a. Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila* plasmatocytes. *Curr. Biol.* 17 (7), 649–654.
- Kurucz, É., Váczi, B., Márkus, R., Laurinyecz, B., Vilmos, P., Zsámboki, J., Csorba, K., Gateff, E., Hultmark, D., Andó, I., 2007b. Definition of *Drosophila* hemocyte subsets by cell-type specific antigens. *Acta. Biol. Hung.* 58, 95–111.
- Kurucz, É., Zettervall, C.J., Sinka, R., Vilmos, P., Pivarsci, A., Ekengren, S., Hegedüs, Z., Andó, I., Hultmark, D., 2003. Hemese, a hemocyte-specific transmembrane protein, affects the cellular immune response in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (5), 2622–2627.
- Külshammer, E., Uhlirova, M., 2012. The actin cross-linker filamin/cheerio mediates tumor malignancy downstream of JNK signaling. *J. Cell. Sci.*
- Labrosse, C., Stasiak, K., Lesobre, J., Grangeia, A., Huguet, E., Drezen, J.M., Poirie, M., 2005. A RhoGAP protein as a main immune suppressive factor in the *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera, Figitidae)-*Drosophila melanogaster* interaction. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 5 (2), 93–103.
- Lanot, R., Zachary, D., Holder, F., Meister, M., 2001. Postembryonic hematopoiesis

in *Drosophila*. Dev. Biol. 230 (2), 243–257.

Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V., Banerjee, U., 2000. Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. Science 288 (5463), 146–149.

Lebestky, T., Jung, S.H., Banerjee, U., 2003. A Serrate-expressing signaling center controls *Drosophila* hematopoiesis. Genes Dev. 17 (3), 348–353.

Lee, H.-H., Norris, A., Weiss, J.B., Frasch, M., 2003. Jelly belly protein activates the receptor tyrosine kinase Alk to specify visceral muscle pioneers. Nature 425, 507–512.

Lemaitre, B., Hoffmann, J., 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. Annu. Rev. Immunol. 25, 697–743.

Ligoxygakis, P., 2013. Genetics of immune recognition and response in *Drosophila* host defense. Adv. Genet. 83, 71–97.

Lorén, C.E., Englund, C., Grabbe, C., Hallberg, B., Hunter, T., Palmer, R.H., 2003. A crucial role for the Anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase in gut development in *Drosophila melanogaster*. EMBO Rep. 4, 781–786.

Luo, H., Hanratty, W.P., Dearolf, C.R., 1995. An amino acid substitution in the *Drosophila* hopTum-I Jak kinase causes leukemia-like hematopoietic defects. EMBO J. 14, 1412–1420.

Mackenzie, D.K., Bussière, L.F., Tinsley, M.C., 2011. Senescence of the cellular immune response in *Drosophila melanogaster*. Exp. Gerontol. 46, 853–859.

Makhijani, K., Alexander, B., Tanaka, T., Rulifson, E., Brückner, K., 2011. The peripheral nervous system supports blood cell homing and survival in the *Drosophila* larva. Development 138 (24), 5379–5391.

Makki, R., Meister, M., Pennetier, D., Ubeda, J.M., Braun, A., Daburon, V., Krzemien, J., Bourbon, H.M., Zhou, R., Vincent, A., Crozatier, M., 2010. A short receptor downregulates JAK/STAT signalling to control the *Drosophila* cellular immune response. PLoS Biol. 8 (8), e1000441.

Manaka, J., Kuraishi, T., Shiratsuchi, A., Nakai, Y., Higashida, H., Henson, P., Nakanishi, Y., 2004. Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by *Drosophila* hemocytes/macrophages. J. Biol. Chem. 279 (46), 48466–48476.

Mandal, L., Banerjee, U., Hartenstein, V., 2004. Evidence for a fruit fly hemangioblast and similarities between lymph-gland hematopoiesis in fruit fly and mammal aorta-gonadal-mesonephros mesoderm. Nat. Genet. 36 (9), 1019–1023.

Mandal, L., Martinez-Agosto, J.A., Evans, C.J., Hartenstein, V., Banerjee, U., 2007. A Hedgehog- and Antennapedia-dependent niche maintains *Drosophila*

- haematopoietic precursors. *Nature* 446 (7133), 320–324.
- Márkus, R., 2007. The origin of hemocytes in *Drosophila melanogaster*. PhD Disszertáció.
- Márkus, R., Kurucz, É., Rus, F., Andó, I., 2005. Sterile wounding is a minimal and sufficient trigger for a cellular immune response in *Drosophila melanogaster*. *Immunol. Lett.* 101 (1), 108–111.
- Márkus, R., Laurinyecz, B., Kurucz, É., Honti, V., Bajusz, I., Sipos, B., Somogyi, K., Kronhamn, J., Hultmark, D., Andó, I., 2009. Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106 (12), 4805–4809.
- Martinek, N., Shahab, J., Saathoff, M., Ringuette, M., 2008. Haemocyte-derived SPARC is required for collagen-IV-dependent stability of basal laminae in *Drosophila* embryos. *J. Cell. Sci.* 121 (Pt 10), 1671–1680.
- Minakhina, S., Steward, R., 2006. Melanotic mutants in *Drosophila* : pathways and phenotypes. *Genetics* 174 (1), 253–263.
- Minakhina, S., Steward, R., 2010. Hematopoietic stem cells in *Drosophila*. *Development* 137, 27–31.
- Moreno, E., Yan, M., Basler, K., 2002. Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the *Drosophila* homolog of the TNF superfamily. *Curr. Biol.* 12, 1263–1268.
- Morris, S.W., Kirstein, M.N., Valentine, M.B., Dittmer, K.G., Shapiro, D.N., Saltman, D.L., Look, A.T., 1994. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 263, 1281–1284.
- Mukherjee, T., Kim, W.S., Mandal, L., Banerjee, U., 2011. Interaction between Notch and Hif-alpha in development and survival of *Drosophila* blood cells. *Science* 332, 1210–1213.
- Muratoglu, S., Garratt, B., Hyman, K., Gajewski, K., Schulz, R.A., Fossett, N., 2006. Regulation of *Drosophila* friend of GATA gene, u-shaped, during hematopoiesis: a direct role for serpent and lozenge. *Dev. Biol.* 296 (2), 561–579.
- Nagaosa, K., Okada, R., Nonaka, S., Takeuchi, K., Fujita, Y., Miyasaka, T., Manaka, J., Andó, I., Nakanishi, Y., 2011. Integrin b m-mediated phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila* embryos. *J. Biol. Chem.* 286 (29), 25770–25777.
- Nappi, A.J., 1973. Hemocytic changes associated with the encapsulation and melanization of some insect parasites. *Exp. Parasitol.* 33, 285–302.
- Nappi, A.J., Vass, E., 1998. Hydrogen peroxide production in immune-reactive *Drosophila melanogaster*. *J. Parasitol.* 84 (6), 1150–1157.

- Narita, R., Yamashita, H., Goto, A., Imai, H., Ichihara, S., Mori, H., Kitagawa, Y., 2004. Syndecan-dependent binding of *Drosophila* hemocytes to laminin alpha3/5 chain LG4-5 modules: potential role in sessile hemocyte islets formation. *FEBS Lett.* 576 (1–2), 127–132.
- Olofsson, B., Page, D.T., 2005. Condensation of the central nervous system in embryonic *Drosophila* is inhibited by blocking hemocyte migration or neural activity. *Dev. Biol.* 279, 233–243.
- Pastor-Pareja, J.C., Wu, M., Xu, T., 2008. An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in *Drosophila*. *Dis. Model Mech.* 1 (2–3), 144–154.
- Potter, C.J., Tasic, B., Russler, E.V., Liang, L., Luo, L., 2010. The Q system: a repressible binary system for transgene expression, lineage tracing, and mosaic analysis. *Cell* 141, 536–548.
- Rehorn, K.P., Thelen, H., Michelson, A.M., Reuter, R., 1996. A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and *Drosophila*. *Development* 122, 4023–4031.
- Rizki, M.T., 1960. Melanotic tumor formation in *Drosophila*. *J. Morphol.* 106, 147–157.
- Rizki, R.M., Rizki, T.M., 1974. Basement membrane abnormalities in melanotic tumor formation of *Drosophila*. *Experientia* 30 (5), 543–546.
- Rizki, R.M., Rizki, T.M., 1979. Cell interactions in the differentiation of a melanotic tumor in *Drosophila*. *Differentiation* 12, 167–178.
- Rizki, R.M., Rizki, T.M., 1990. Parasitoid virus-like particles destroy *Drosophila* cellular immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 8388–8392.
- Rizki, R.M., Rizki, T.M., 1991. Effects of lamelloglysin from a parasitoid wasp on *Drosophila* blood cells in vitro. *J. Exp. Zool.* 257, 236–244.
- Rizki, T.M., Rizki, R.M., 1959. Functional significance of the crystal cells in the larva of *Drosophila melanogaster*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5 (2), 235–240.
- Rizki, T.M., Rizki, R.M., 1980. Properties of the larval hemocytes of *Drosophila melanogaster*. *Experientia* 36 (10), 1223–1226.
- Rizki, T.M., Rizki, R.M., 1992. Lamellocyte differentiation in *Drosophila* larvae parasitized by *Leptopilina*. *Dev. Comp. Immunol.* 16 (2–3), 103–110.
- Röhrborn, G., 1961. *Drosophila* tumors and the structure of larval lymph glands. *Experientia* 17, 507–509.
- Rus, F., Kurucz, É., Márkus, R., Sinenko, S.A., Laurinyecz, B., Pataki, C., Gausz, J., Hegedüs, Z., Udvardy, A., Hultmark, D., Andó, I., 2006. Expression pattern of Filamin-240 in *Drosophila* blood cells. *Gene Exp. Patterns* 6 (8), 928–934.

- Russo, J., Dupas, S., Frey, F., Carton, Y., Brehelin, M., 1996. Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina boulardi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. *Parasitology* 112 ( Pt 1), 135–142.
- Samakovlis, C., Kimbrell, D.A., Kylsten, P., Engström, A., Hultmark, D., 1990. The immune response in *Drosophila* : pattern of cecropin expression and biological activity. *EMBO J.* 9 (9), 2969–2976.
- Shatoury, H.H.E., 1955. The structure of the lymph glands of *Drosophila* larvae. *W. Roux' Archiv f. Entwicklungsmechanik* 147, 489–495.
- Shim, J., Gururaja-Rao, S., Banerjee, U., 2013. Nutritional regulation of stem and progenitor cells in *Drosophila*. *Development* 140, 4647–4656.
- Shim, J., Mukherjee, T., Banerjee, U., 2012. Direct sensing of systemic and nutritional signals by haematopoietic progenitors in *Drosophila*. *Nat. Cell. Biol.* 14 (4), 394–400.
- Shrestha, R., Gateff, E., 1982. Ultrastructure and cytochemistry of the cell-types in the tumorous hematopoietic organs and the hemolymph of the mutant Lethal (1) Malignant Blood Neoplasm (l(1)mbn) of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Growth Differ.* 1 (24), 83–98.
- Shrestha, R., Gateff, E., 1986. Ultrastructure and cytochemistry of the tumorous blood cells in the mutant Lethal(3)malignant blood neoplasm of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Invertebrate Pathology* 48, 1–12.
- Siekhaus, D., Haesemeyer, M., Moffitt, O., Lehmann, R., 2010. RhoL controls invasion and Rap1 localization during immune cell transmigration in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* 12, 605–610.
- Siekhaus, D., Haesemeyer, M., Moffitt, O., Lehmann, R., 2010. RhoL controls invasion and Rap1 localization during immune cell transmigration in *Drosophila*. *Nat. Cell. Biol.* 12 (6), 605–610.
- Silvers, M., Hanratty, W.P., 1984. Alterations in the production of hemocytes due to a neoplastic mutation of *Drosophila melanogaster*. *J. Invertebr. Pathol.* 44, 324–328.
- Sinenko, S.A., Mathey-Prevot, B., 2004. Increased expression of *Drosophila* tetraspanin, Tsp68C, suppresses the abnormal proliferation of ytr-deficient and Ras/Raf-activated hemocytes. *Oncogene* 23, 9120–9128.
- Sinenko, S.A., Shim, J., Banerjee, U., 2012. Oxidative stress in the haematopoietic niche regulates the cellular immune response in *Drosophila*. *EMBO Rep.* 13, 83–89.
- Sluss, H.K., Davis, R.J., 1997. Embryonic morphogenesis signaling pathway mediated by JNK targets the transcription factor JUN and the TGF-beta homologue decapentaplegic. *J. Cell. Biochem.* 67, 1–12.



- Somogyi, K., Sipos, B., Péntes, Z., Kurucz, É., Zsámboki, J., Hultmark, D., Andó, I., 2008. Evolution of genes and repeats in the Nimrod superfamily. *Mol. Biol. Evol.* 25 (11), 2337–2347.
- Sorrentino, R.P., Carton, Y., Govind, S., 2002. Cellular immune response to parasite infection in the *Drosophila* lymph gland is developmentally regulated. *Dev. Biol.* 243 (1), 65–80.
- Sorrentino, R.P., Melk, J.P., Govind, S., 2004. Genetic analysis of contributions of dorsal group and JAK-Stat92E pathway genes to larval hemocyte concentration and the egg encapsulation response in *Drosophila*. *Genetics* 166 (3), 1343–1356.
- Sorrentino, R.P., Tokusumi, T., Schulz, R.A., 2007. The Friend of GATA protein U-shaped functions as a hematopoietic tumor suppressor in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 311 (2), 311–323.
- Stofanko, M., Kwon, S.Y., Badenhorst, P., 2008. A misexpression screen to identify regulators of *Drosophila* larval hemocyte development. *Genetics* 180 (1), 253–267.
- Stofanko, M., Kwon, S.Y., Badenhorst, P., 2010. Lineage tracing of lamellocytes demonstrates *Drosophila* macrophage plasticity. *PLoS One* 5 (11), e14051.
- Stramer, B., Wood, W., Galko, M.J., Redd, M.J., Jacinto, A., Parkhurst, S.M., Martin, P., 2005. Live imaging of wound inflammation in *Drosophila* embryos reveals key roles for small GTPases during in vivo cell migration. *J. Cell. Biol.* 168 (4), 567–573.
- Stuart, L.M., Ezekowitz, R.A., 2008. Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 131–141.
- Tao, Y., Schulz, R.A., 2007. Heart development in *Drosophila*. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18, 3–15.
- Tepass, U., Fessler, L.I., Aziz, A., Hartenstein, V., 1994. Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development* 120, 1829–1837.
- Terriente-Felix, A., Li, J., Collins, S., Mulligan, A., Reekie, I., Bernard, F., Krejci, A., Bray, S., 2013. Notch cooperates with Lozenge/Runx to lock haemocytes into a differentiation programme. *Development* 140 (4), 926–937.
- Tokusumi, T., Shoue, D.A., Tokusumi, Y., Stoller, J.R., Schulz, R.A., 2009. New hemocyte-specific enhancer-reporter transgenes for the analysis of hematopoiesis in *Drosophila*. *Genesis* 47 (11), 771–774.
- Tokusumi, Y., Tokusumi, T., Shoue, D.A., Schulz, R.A., 2012. Gene regulatory networks controlling hematopoietic progenitor niche cell production and differentiation in the *Drosophila* lymph gland. *PLoS One* 7 (7), e41604.
- Tucker, P.K., Evans, I.R., Wood, W., 2011. Ena drives invasive macrophage migration in *Drosophila* embryos. *Dis. Model. Mech.* 4 (1), 126–134.

- Ulvila, J., Vanha-Aho, L.-M., Rämetsä, M., 2011. *Drosophila* phagocytosis - still many unknowns under the surface. *APMIS* 119, 651–662.
- Waltzer, L., Ferjoux, G., Bataillé, L., Haenlin, M., 2003. Cooperation between the GATA and RUNX factors Serpent and Lozenge during *Drosophila* hematopoiesis. *EMBO J.* 22 (24), 6516–6525.
- Wang, M.C., Bohmann, D., Jasper, H., 2003. JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *Dev. Cell* 5, 811–816.
- Wellmann, A., Doseeva, V., Butscher, W., Raffeld, M., Fukushima, P., Stetler-Stevenson, M., Gardner, K., 1997. The activated anaplastic lymphoma kinase increases cellular proliferation and oncogene up-regulation in rat 1a fibroblasts. *FASEB J.* 11, 965–972.
- Williams, M.J., 2007. *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *J. Immunol.* 178, 4711–4716.
- Williams, M.J., Andó, I., Hultmark, D., 2005. *Drosophila melanogaster* Rac2 is necessary for a proper cellular immune response. *Genes Cells* 10 (8), 813–823.
- Willott, E., Trenczek, T., Thrower, L.W., Kanost, M.R., 1994. Immunochemical identification of insect hemocyte populations: monoclonal antibodies distinguish four major hemocyte types in *manduca sexta*. *Eur. J. Cell Biol.* 65, 417–423.
- Wood, W., Faria, C., Jacinto, A., 2006. Distinct mechanisms regulate hemocyte chemotaxis during development and wound healing in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell. Biol.* 173, 405–416.
- Wood, W., Jacinto, A., 2007. *Drosophila melanogaster* embryonic haemocytes: masters of multitasking. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 542–551.
- Zanet, J., Stramer, B., Millard, T., Martin, P., Payre, F., Plaza, S., 2009. Fascin is required for blood cell migration during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 136 (15), 2557–2565.
- Zettervall, C.J., Anderl, I., Williams, M.J., Palmer, R., Kurucz, É., Andó, I., Hultmark, D., 2004. A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (39), 14192–14197.
- Zsámboki, J., Csordás, G., Honti, V., Pintér, L., Bajusz, I., Galgóczy, L., Andó, I., Kurucz, É., 2013. *Drosophila* Nimrod proteins bind bacteria. *Cent. Eur. J. Biol.* 7, 633–645.

## 9. Saját közlemények jegyzéke

### A dolgozat alapját képező közlemények:

V. Honti, G. Csordás, R. Márkus, É. Kurucz, F. Jankovics, I. Andó. Cell lineage tracing reveals the plasticity of the hemocyte lineages and of the hematopoietic compartments in *Drosophila melanogaster*. Mol Immunol., 47(11-12) (2010),pp. 1997-2004. **IF: 2.916** MTMT: 1921048

V. Honti, G. Csordás, É. Kurucz, R. Márkus, I. Andó. The cell-mediated immunity of *Drosophila melanogaster*: hemocyte lineages, immune compartments, microanatomy and regulation. Dev Comp Immunol. 42(1) (2014),pp. 47-56. (Összefoglaló) **IF: 3.238** MTMT: 2372553

G. Csordás, G.I.B. Varga, V. Honti, F. Jankovics, É. Kurucz, I. Andó. In vivo immunostaining of hemocyte compartments in *Drosophila* for live imaging. PLOS One. 9(6) (2014): e98191. **IF: 3.534** MTMT: 2708773

### További közlemények:

V. Honti, É. Kurucz, G. Csordás, B. Laurinyecz, R. Márkus, I. Andó. In vivo detection of lamellocytes in *Drosophila melanogaster*. Immunol Lett., 126(1-2) (2009),pp. 83-84. **IF: 2.906** MTMT: 1920812

B. Kari, J. Zsámboki, V. Honti, G. Csordás, R. Márkus, I. Andó, É. Kurucz. A novel method for the identification of factors involved in host-pathogen interactions in *Drosophila melanogaster*. J Immunol Methods. 398-399 (2013),pp. 76-82. **IF: 2.225** MTMT: 2463198

V. Honti, Gy. Cinege, G. Csordás, É. Kurucz, J. Zsámboki, C.J. Evans, U. Banerjee, I. Andó. Variation of NimC1 expression in *Drosophila* stocks and transgenic strains. Fly (Austin). 7(4) (2013),pp. 263-266. **IF: 1.105** MTMT: 2372552

J. Zsámboki, G. Csordás, V. Honti, L. Pintér, I. Bajusz, L. Galgóczy, I. Andó, É. Kurucz. *Drosophila* Nimrod proteins bind bacteria. Centr Eur J Biol 8(7), pp. 633-645. **IF: 0.818** MTMT: 2326115

G. Csordás, V. Honti, R. Márkus R, F. Jankovics, G.I.B. Varga, É. Kurucz É, I. Andó. Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) vérsejtképződése. Tudomány a vidék mindennapjaiban: Magyar Tudomány Ünnepe ISBN:978-963-306-245-6 (2013),pp. 23-28. (Könyvrészlet/Digitális kiadvány magyar nyelven) MTMT: 2519808

## 10. A rövidítések jegyzéke

### Gének:

**Alk:** Anaplastic lymphoma kinase

**Bc:** Black cells

**chn:** charlatan

**crq:** croquemort

**Dot:** Dorothy

**EBF:** Early B-cell Factor

**gcm:** glial cells missing

**He:** hemese

**hep:** hemipterous

**Hml:** Hemolectin

**l(3)mbn:** lethal(3)malignant blood neoplasm

**lz:** lozenge

**Pvf1, Pvf2, Pvf3:** PDGF- and VEGF-related factor1, 2, 3

**Pvr:** PDGF and VEGF- receptor related

**Pxn:** peroxidasin

**simu:** six microns under (Nimrod C4)

**srp:** serpent

**ush:** u-shaped

### Genotípusok, genetikai konstrukciók:

**AFG:** Actin flip-out-GAL4

**CFP:** *Cyan Fluorescent Protein*

**FLP:** *Flip-rekombináz*

**GFP:** *Green Fluorescent Protein*

**Ore-R:** *Oregon-R*

**UAS:** *upstream activating sequence*

**Anatómiai kifejezések:**

**CZ:** kortikális zóna (központi nyirokszerv)

**DP:** dorzális sziget (szesszilis szövet)

**LB:** keresztirányú sáv (szesszilis szövet)

**LG:** lymph gland (központi nyirokszerv)

**MZ:** medulláris zóna (központi nyirokszerv)

**PHT:** posterior hematopoietic tissue (poszterior hematopoietikus szövet)

**PSC:** posterior signaling center (poszterior szignalizációs központ)

**Vegyszerek:**

**Alx:** Alexa Fluor

**BSA:** bovine serum albumin

**BrdU:** 5-bromo-2-deoxyuridine

**DAPI:** 4',6'-diamidino-2-phenylindole

**FCS:** foetal calf serum

**FITC:** fluorescein isothiocyanate

**Ig:** immunglobulin

**PBS:** phosphate buffered saline

**PTU:** 1-fenil-2-tiourea

**TRITC:** tertamethyl rhodamine isothiocyanate